



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

INFLUÊNCIA DO VOLUME GLOBAL DE TUMOR AJUSTADO PARA CADA ANIMAL,  
DETERMINADO A PARTIR DE UM RÁCIO CRÂNIO-TUMORAL, NO PROGNÓSTICO DO  
MELANOMA MALIGNO ORAL NO CÃO

MARGARIDA VICENTE GOUVEIA VIEIRA DA ROCHA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Miguel Alves Carreira

Doutora Sandra de Oliveira Tavares de

Sousa Jesus

Doutora Lisa Alexandra Pereira Mestrinho

ORIENTADORA

Doutora Lisa Alexandra Pereira Mestrinho

CO-ORIENTADOR

Dr. Joaquim Garcia Pereira Henriques

2018

LISBOA

---





UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

INFLUÊNCIA DO VOLUME GLOBAL DE TUMOR AJUSTADO PARA CADA ANIMAL,  
DETERMINADO A PARTIR DE UM RÁCIO CRÂNIO-TUMORAL, NO PROGNÓSTICO DO  
MELANOMA MALIGNO ORAL NO CÃO

MARGARIDA VICENTE GOUVEIA VIEIRA DA ROCHA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Miguel Alves Carreira

Doutora Sandra de Oliveira Tavares de

Sousa Jesus

Doutora Lisa Alexandra Pereira Mestrinho

ORIENTADORA

Doutora Lisa Alexandra Pereira Mestrinho

CO-ORIENTADOR

Dr. Joaquim Garcia Pereira Henriques

2018

LISBOA

---

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, quero agradecer à Doutora Lisa Mestrinho por ter aceite orientar a minha tese de mestrado e por todo o apoio e paciência que sempre disponibilizou.

Ao Dr. Joaquim Henriques, co-orientador, por me ter aceite como estagiária no Hospital Veterinário de Berna e ter partilhado comigo o seu vasto conhecimento e experiência.

Ao Professor Telmo Nunes por ter sido sempre tão prestável e simpático.

A toda a equipa do Hospital Veterinário de Berna, por me terem recebido tão bem e por toda a ajuda e ensinamentos. Com todos vós aprendi valiosas lições que me irão acompanhar ao longo da minha vida pessoal e profissional.

Ao Hospital Escolar Veterinário, em particular ao Doutor António Ferreira e ao Dr. António Almeida e Dr. Óscar Gamboa e também ao Hospital Veterinário do Oeste e ao Hospital Veterinário do Restelo pela cedência de casos e tomografias computadorizadas (TCs) para o meu estudo.

Às minhas Queridas amigas que fiz nesta mui nobre instituição. Convosco cresci muito e tornei-me uma pessoa melhor e mais feliz. Partihámos os melhores, mas também os piores momentos desta vida universitária. Adoro-vos, Bea, Cati, Fonseca, Meireles, Salomé e Valadares!!

Aos meus colegas de turma, por terem sido tão bons companheiros em todas as aulas, épocas de exame, saídas de campo e festas, principalmente aos Queridos honorários.

Às minhas amigas do colégio, por serem as minhas confidentes e melhores amigas desde há tantos anos. Obrigada Coqui, Lulu, Margarida, Sara Luz e Tata, adoro-vos a todas!

Ao Tiago, por ser a excelente pessoa que é e sempre me ter apoiado nos meus melhores e piores momentos. Sem ti tudo teria sido muito mais difícil e menos espetacular. Obrigada por TUDO!!!

Por último, queria deixar um agradecimento muito especial à minha família. Obrigada por me terem sempre proporcionado todos os recursos para que eu tivesse um percurso escolar e universitário de sucesso e conseguisse cumprir o meu sonho de infância, o de ser Médica Veterinária. Obrigada mãe e pai por todo o apoio emocional e incondicional que me deram desde sempre! Obrigada mano por teres feito com que os piores momentos parecessem menos maus e me animares! Obrigada Yoda e Anakin, os meus gatos, por serem os meus fiéis companheiros desde o final do 3º ano de faculdade. Obrigada ao Mário, o meu cágado por esticar sempre o pescocinho quando eu passo, quer seja verão ou inverno.



## **Influência do rácio crânio-tumoral no melanoma maligno oral no cão**

### **Resumo**

O volume tumoral é um fator de prognóstico reconhecido. No entanto, no que diz respeito aos tumores orais no cão, é possível que a variabilidade anatômica tenha influência no peso do volume tumoral. Assim, o presente estudo avaliou, de forma retrospectiva, o rácio crânio-tumoral (C-T) enquanto fator prognóstico no melanoma maligno oral (MMO) em 16 cães com estadiamento tomográfico local e/ou radiográfico distante.

A mediana da sobrevida global dos animais em estudo foi de 168 dias, não tendo sido observadas diferenças significativas entre os grupos MMO metastizado e não metastizado. A metastização linfática e/ou sistêmica verificou-se em 56,25% dos cães.

Não foram verificadas diferenças significativas entre os valores do rácio C-T entre cães com MMO metastizado e não metastizado, não sendo possível determinar um valor de corte de rácio C-T preditivo.

Apesar de se tratar de uma amostra limitada, o rácio C-T poderá ser um parâmetro anatômico promissor no estadiamento do MMO no cão. Serão precisos mais estudos, com um maior número de animais para se determinar um valor de corte, se existir, preditivo de ocorrência de metástases.

Palavras-chave: melanoma oral, rácio crânio-tumoral, prognóstico, cão, oncologia



## **Influence of skull-tumour ratio in canine oral malignant melanoma**

### **Abstract**

Even though tumour volume is a well-known prognostic factor in canine oral tumours, anatomical disparity may have an impact on tumour volume. Thus, this retrospective study evaluated the skull-tumour (S-T) ratio as a prognostic factor in oral malignant melanoma (MMO) in a total of 16 dogs with regional tomographic staging and distant tomographic or radiographic staging.

The median survival time was 168 days and no differences were observed between dogs with metastatic and non-metastatic OMM. Metastatic disease (lymphatic and/or systemic) was identified in 56.25% of cases.

No significant differences were found between the S-T ratio of dogs with metastatic and non-metastatic MMO. Therefore, it was not possible to determine a predictive S-T ratio cut-off value.

However, despite the limited sample, S-T ratio may be a promising anatomical parameter in staging of canine OMM. Hence, more studies with larger samples will be needed to determine a predictive cut-off value, if any, for presence of metastatic disease.

Key-words: oral melanoma, skull-tumour ratio, prognostic, dog, oncology





<b>Índice</b>	
<b>Agradecimentos</b>	iii
<b>Resumo</b>	iv
<b>Abstract</b>	vi
<b>Lista de figuras</b>	xii
<b>Lista de tabelas</b>	xiii
<b>Lista de gráficos</b>	xiv
<b>Lista de anexos</b>	xv
<b>Lista de abreviaturas e siglas</b>	xvi
<b>Descrição das atividades desenvolvidas durante o estágio curricular</b>	1
<b>Introdução</b>	1
<b>Atividades desenvolvidas</b>	1
Internamento	1
Imagiologia	2
Cirurgia	2
Medicina Interna	2
Poster e estudo retrospectivo	3
<b>Revisão Bibliográfica</b>	5
<b>Neoplasias melanocíticas no cão</b>	5
<b>Melanomas orais</b>	5
<b>Oncogénese</b>	6
<b>Metastização</b>	7
<b>Epidemiologia</b>	9
<b>Sinais clínicos</b>	11
<b>Diagnóstico</b>	11
Clínico	11
Microscópico	12
• Imuno-histoquímica	12
• Hibridização <i>in situ</i>	13
Imagiológico	13

<b>Estadiamento</b> .....	13
<b>Tratamento</b> .....	18
Cirúrgico .....	19
Médico .....	20
• Quimioterapia .....	20
• Imunoterapia.....	20
• Radioterapia .....	21
Outros tratamentos .....	21
<b>Seguimento</b> .....	22
<b>Prognóstico</b> .....	22
<b>Valor prognóstico do volume tumoral total no melanoma maligno oral canino – Estudo retrospectivo</b> .....	24
<b>Objetivos</b> .....	24
<b>Materiais e métodos</b> .....	24
Critérios de inclusão .....	24
Volume tridimensional do tumor primário e do crânio.....	24
Rácio crânio-tumoral.....	26
Análise estatística.....	28
<b>Resultados</b> .....	29
Caracterização da amostra .....	29
Volume do Tumor Primário (VTP) .....	30
Volume Tridimensional do Crânio (VTC).....	31
Rácio Crânio-Tumoral (C-T).....	31
Rácio C-T e metastização linfática e sistêmica .....	32
Valor preditivo do rácio C-T para a metastização nos linfonodos cervicais .....	32
Análise de sobrevida global .....	35
Teste de Kaplan-Meier para todos os animais em estudo.....	36
Comparação das curvas de Kaplan-Meier dos animais com (grupo 2) e sem metastização (grupo 1) do MMO.....	37
<b>Discussão</b> .....	39

Associação entre o rácio C-T e a presença de metástases linfáticas e/ou sistémicas ..	45
<b>Conclusões .....</b>	<b>47</b>
<b>Bibliografia .....</b>	<b>48</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>57</b>



## Lista de figuras

Figura 1 - Imagem TC (plano axial).....	25
Figura 2 - Imagem TC (plano sagital).....	25
Figura 3 - Imagem TC (plano coronal) .....	26
Figura 4 - Imagens TC com medidas do tumor, posteriormente utilizadas no cálculo do VTP .....	26

## Lista de tabelas

Tabela 1 - Classificação TNM da organização mundial de saúde (OMS) de neoplasias orais no cão (adaptado de Owen, 1980) .....	14
Tabela 2 - Transformação logarítmica do rácio C-T .....	31
Tabela 3 - Relação sensibilidade/especificidade para diferentes valores de rácio C-T relativamente à metastização nos linfonodos cervicais .....	33
Tabela 4 - Relação sensibilidade/especificidade para diferentes valores de rácio C-T relativamente à metastização nos pulmões .....	34
Tabela 5 - Tempos de sobrevivência e status de cada animal .....	36
Tabela 6 - Mediana (e os respetivos intervalos de confiança) e erro-padrão da análise de sobrevivência de Kaplan-Meier .....	37
Tabela 7 - Média e mediana (e os respetivos intervalos de confiança) e erro-padrão das análises de sobrevivência de Kaplan-Meier para os cães com e sem metástases .....	38
Tabela 8 - Animais constituintes da amostra e as medições realizada .....	57

## Lista de gráficos

Gráfico 1 - Estadiamento clínico dos indivíduos do estudo .....	30
Gráfico 2 - Gráfico de bigodes resultante do teste U de Mann-Whitney .....	32
Gráfico 3 - Curva ROC do rácio C-T relativamente à metastização linfática .....	33
Gráfico 4 - Curva ROC do rácio C-T relativamente à metastização nos pulmões .....	35
Gráfico 5 - Análise de sobrevivência de Kaplan-Meier dos animais em estudo.....	36
Gráfico 6 - Curva de Kaplan-Meier referente aos cães com MMO não metastizado e curva de Kaplan-Meier referente aos cães com MMO metastizado, representadas num único plano cartesiano .....	37



## **Lista de anexos**

Anexo I - Diversos dados relativos aos animais constituintes deste trabalho .....	57
-----------------------------------------------------------------------------------	----

## Lista de abreviaturas e siglas

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ARNm - Ácido ribonucleico mensageiro

AUC – Área sob a curva (*Area Under the Curve*)

CAMV – Centros de atendimento médico-veterinários

CDK - Cinases Dependentes de Ciclinas (*Cyclin-dependent kinase*)

cm – Centímetro

cm<sup>3</sup> – Centímetro cúbico

C-T – Crânio-tumoral

HVB – Hospital Veterinário de Berna

HEV– Hospital Escolar Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa

HVO – Hospital Veterinário do Oeste

IBF9 – Anticorpo murino monoclonal

IC – Intervalo de Confiança

Inc. – Incorporação (*Incorporation*)

INK – Inibidores das cinases dependents de ciclinas (*INhibitors of CDK*)

Ki-67 - Marcador de proliferação celular

kg – quilograma

L - Lábio

LFNS – Linfonodos Sentinela

Melan-A – Antígeno de melanoma reconhecido por células-T (*Melanoma Antigen Recognized by T-cells*)

MbC – Mandíbula caudal

MbR – Mandíbula rostral

MMO – Melanoma Maligno Oral Canino

MV - Médico Veterinário

MxC – Maxila caudal

MxR – Maxila rostral

OMS – Organização Mundial de Saúde

OVH – Ovariohisterectomia

p – Nível de significância

p53 – Proteína 53

PAAF – Punção Aspirativa com Agulha Fina

RB1 – Retinoblastoma 1

ROC - Característica de Operação do Receptor (*Receiver Operating Characteristic*)

RM – Ressonância Magnética

TC – Tomografia Computorizada

TNM - Tumor, Linfonodos, Metástases (*Tumor, Nodes, Metastasis*)

TPLO – Osteotomia Nivelamento Plateau Tibial (*Tibial Plateau Leveling Osteotomy*)

VEGF – Fator de Crescimento Endotelial Vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*)

VSSO – Sociedade Veterinária de Cirurgia Oncológica (*Veterinary Society of Surgical Oncology*)

VTC – Volume tridimensional do crânio

VTP – Volume tridimensional do tumor primário

Waf-1 - *Wildtype p53-Activated Fragment 1*

## **Descrição das atividades desenvolvidas durante o estágio curricular**

### **Introdução**

O estágio curricular decorreu entre 12 de setembro de 2016 e 14 de abril de 2017, no Hospital Veterinário de Berna. A escolha do local de estágio baseou-se no facto de este ser um centro médico-veterinário de referência, nomeadamente na área de oncologia. Tendo em conta que os turnos eram de 8h ou de 9h, incluindo feriados e, por vezes, noites e fins-de-semana, estagiei cerca de 1400 horas, distribuídas por 7 meses, nos diversos serviços do hospital e sob co-orientação do Dr. Joaquim José Garcia Pereira Henriques, diretor clínico do Hospital Veterinário de Berna (HVB). Este estágio permitiu-me desenvolver e adquirir novas competências nas diferentes áreas da medicina veterinária. Neste sentido, verifiquei uma melhoria da minha autonomia, do meu sentido de responsabilidade e da interação e comunicação com os clientes. Neste estágio, aperfeiçoei, também, o meu espírito de equipa através da interação e ajuda com os médicos, enfermeiros e auxiliares do HVB. Realço ainda o facto de este ser um hospital cuja casuística de casos oncológicos ronda os 70% da totalidade dos casos. Desta forma, a oncologia, que era uma área na qual eu não tinha qualquer experiência, tornou-se o meu dia-a-dia, permitindo-me evoluir e conhecer de forma muito mais aprofundada e detalhada esta área da medicina veterinária que, hoje em dia, constitui um dos principais motivos de consulta nos animais geriátricos.

### **Atividades desenvolvidas**

#### Internamento

A adaptação ao modo de funcionamento e ao ambiente do HVB é feita no internamento, onde estive 470 horas. A unidade de internamento é composta por 3 diferentes secções: o internamento dos gatos, o internamento dos cães e o internamento dos animais com suspeita ou confirmação de doenças infectocontagiosas. No internamento, desempenhei diversas funções, nomeadamente: a administração de fármacos e de fluidoterapia, sendo que havia, pelo menos 3 rondas de medicação por dia; a alimentação dos animais internados, sendo que, muitos deles não comiam sozinhos e, como tal, era necessário incentivá-los a comer, forçá-los ou, em casos de animais com tubo esofágico ou nasogástrico, a alimentação era feita pelo tubo; a contenção adequada dos animais internados e dos que vinham das consultas externas para o internamento fazer algum procedimento; a supervisão e controlo de transfusões de sangue total, concentrado de eritrócitos e de plasma; a limpeza de *boxes* e de caixas de areia; passeio dos cães

internados; ajuda e realização de diversos procedimentos tais como colheitas de sangue, punções aspirativas com agulha fina - PAAFs, cistocentese, entre outros; acompanhamento pré e pós-cirúrgico participando nos protocolos realizados. Participei em situações de emergência como circulante e com função ativa em procedimentos de reanimação.

### Imagiologia

No HVB estão disponíveis 4 tipos de exames imagiológicos: a ecografia, o raio-X, a TC e a endoscopia. No total, despendi 380 horas do meu estágio curricular nesta área. Tive a oportunidade de acompanhar diversas ecografias e ecocardiografias, participando na escrita dos relatórios médicos das mesmas; no serviço de TC pude auxiliar na anestesia dos animais e realização do exame; realizei ainda diversas radiografias, ajudando, também, na interpretação das imagens obtidas; por último, a nível da endoscopia, pude observar rinoscopias, broncoscopias, esofagogastroduodenoscopias, colonoscopias, otoscopias, cistoscopias, laparoscopias, e ainda cirurgias minimamente invasivas (ovariohisterectomia - OVH, biópsias, etc.).

### Cirurgia

No serviço de cirurgia, onde passei 460 horas, desempenhei funções de ajudante de cirurgião, anestesiológista e circulante em inúmeros procedimentos. Procedimentos cirúrgicos: gerais – ovário-histectomia, nodulectomia, esplenectomia, biópsias, etc.; ortopédicos - biópsias, osteotomia nivelamento plateau tibial - TPLO, osteossíntese, amputações; oftalmológicos - enucleação do globo ocular, recolocação de prolapso da glândula de Harder, exérese de adenomas palpebrais; e odontológicos - destartarizações, extrações dentárias, infiltração de sais de ouro). Contudo, a maioria das cirurgias que tiveram lugar no HVB eram oncológicas, de intuito curativo ou paliativo, destacando-se o esvaziamento ganglionar, tireoidectomia, mandibulectomia e maxilectomia.

### Medicina Interna

Ao longo do estágio tive a possibilidade de assistir a consultas de diversas especialidades, nomeadamente, oftalmologia, dermatologia, cardiologia, ortopedia, fisioterapia e oncologia, na qual existiu um maior tempo de contacto. Nas consultas pude, para além de assistir, ajudar na contenção dos animais, realizar anamneses, exames físicos e colher amostras (sangue, PAAFs, etc.). Fora do âmbito da consulta, tive a oportunidade de auxiliar em várias sessões de quimioterapia com diversos fármacos quimioterápicos. Para além disso, participei também em protocolos de eletroquimioterapia.

Apesar de ter sido um evento único, assisti também a uma consulta ao domicílio, sendo que o serviço de ambulatório faz parte do núcleo de serviços do HVB.

### Poster e estudo retrospectivo

Durante o meu estágio participei em estudos clínicos em curso no HVB. Um dos trabalhos culminou na realização de um *poster* intitulado “Comparação entre a apresentação clínica de cães com tumores cardíacos e o diagnóstico histopatológico definitivo” apresentado no XIII Congresso de Medicina Veterinária organizado pelo Hospital Veterinário Montenegro. Num segundo trabalho, fui responsável pela recolha do histórico de cães com diagnóstico de mastocitoma.



## **Revisão Bibliográfica**

### **Neoplasias melanocíticas no cão**

As neoplasias melanocíticas no cão podem ser benignas ou malignas (melanomas) (Smith, Goldschmidt & McManus, 2002; Spangler & Kass, 2006; Nishiya et al., 2016). Na espécie canina os melanomas perfazem cerca de 3% da totalidade dos tumores e, aproximadamente, 7% das neoplasias malignas (Smith et al., 2002). Contudo, no caso particular da cavidade oral, o melanoma é o tumor maligno mais diagnosticado no cão (Bergman, Kent & Farese, 2013; Kirpensteijn & Boston, 2016).

Por sua vez, os melanomas podem ser classificados de acordo com a intensidade de pigmentação em melanomas melanóticos e amelanóticos. Estes podem ainda ser classificados numa das seguintes variantes ou subtipos histológicos, as quais são muito menos diagnosticadas: melanomas com atividade juncional e com atividade dérmica. Nesta segunda variante encontram-se descritos melanomas de células fusiformes, poligonais ou mistos, tendo já sido descritos, embora sejam incomuns, de células balonizantes (Smith et al., 2002; Gross, Ihrke, Walder & Affolter, 2005; Liptak & Withrow, 2013; Goldschmidt & Goldschmidt, 2016).

### **Melanomas orais**

Os melanomas malignos orais (MMO) em medicina humana são maioritariamente tumores primários, embora possam também ser secundários a melanomas existentes noutras localizações (Kumar et al., 2015).

Histologicamente, os MMO são, normalmente constituídos por agregações intra-epiteliais de células poliédricas de grandes dimensões cujo citoplasma contém abundantes grânulos. Estas células são hipercromáticas, de núcleos redondos ou ovais com um ou dois nucléolos proeminentes que se dispõem em lóbulos irregulares, encontrando-se separadas por fibras de colagénio (Weiss & Frese, 1974; Bostock, 1979).

Dentro da cavidade oral, o melanoma maligno pode surgir na gengiva, no palato, na língua, na faringe, na mucosa labial ou na mucosa jugal (Freeman, Hahn, Harris & King, 2003). Os melanomas malignos localizados na mucosa labial estão associados a menor mortalidade. No entanto, este facto pode não ser devido a uma menor malignidade intrínseca associada à localização, mas sim devido à sua deteção mais precoce, uma vez que é facilmente visível, e ainda devido à facilidade de exérese cirúrgica quando comparada com os tumores localizados dentro da cavidade oral (Spangler & Kass, 2006; Esplin, 2008).



A taxa de metastização desta neoplasia ronda os 80% e os locais onde este processo se verifica com maior frequência são os linfonodos e, em segundo lugar, os pulmões, podendo também afetar outros órgãos como o cérebro, o coração e o fígado (Freeman et al., 2003; Biller et al., 2016).

## **Oncogénese**

A oncogénese é um processo complexo que resulta de múltiplas interações entre fatores ambientais e genéticos. De uma forma transversal reconhece-se 4 fases essenciais para a iniciação e progressão dos tumores em geral e do MMO em particular. Em primeiro lugar, o desenvolvimento de instabilidade genética – a iniciação. A instabilidade genética, também designada por taxa de mutação acumulada, é um fator fundamental para que algumas linhagens celulares acumulem alterações genéticas suficientes para originar uma neoplasia em tempo de vida útil (neste caso, no tempo de vida dos cães). Esta pode ser, essencialmente, classificada como instabilidade cromossómica ou instabilidade molecular / de microssatélites (sequências de ADN repetitivas). Nesta última, existe uma deficiente capacidade de reparação do ADN por parte da célula. Em segundo lugar, o aumento da proliferação celular associado a uma produção de células alteradas – a progressão. Em terceiro lugar, a aquisição de características invasivas - a invasão. E em quarto e último lugar, a promoção da angiogénese tumoral. A angiogénese é um processo fisiológico caracterizado pela proliferação, migração e morfogénese de células endoteliais de vasos sanguíneos. À medida que o tumor aumenta de tamanho, as células situadas no seu interior ficam mais afastadas da corrente sanguínea e tornam-se relativamente hipóxicas. A hipóxia regula positivamente a expressão de vários fatores angiogénicos nas células tumorais. Assim, a angiogénese tumoral promove o aumento da densidade vascular e linfática do tumor, aumentando a probabilidade de disseminação de células tumorais e a colonização de locais secundários - a metastização. No MMO alguns fatores iniciadores e promotores têm sido implicados, nomeadamente agressões crónicas (mecânicas ou inflamatórias), no entanto, a oncogénese só se desenrola quando existem um, ou vários, fatores promotores. Adicionalmente, sabe-se que existem fatores genéticos e moleculares associados aos tumores melanocíticos no cão (Smith et al., 2002; Sulaimon & Kitchel, 2003; Machado, 2007; Bergman et al., 2013; Bielenberg & Zetter, 2015; Munday, Löhr & Kiupel, 2016). Assim, a evolução das fases moleculares descritas não surge de um único evento, mas sim de um conjunto que resulta na desregulação de genes supressores tumorais e de oncogenes, estas podem ser mutações em genes que codificam proteínas que regulam os genes supressores de tumores, mutações de proto-oncogenes e consequente formação de

oncogenes, e suprarregulação de fatores angiogénicos e de outros fatores de crescimento (Smith et al., 2002; Sulaimon & Kitchel, 2003; Modiano, 2013).

No caso dos genes supressores de tumores, como é o exemplo dos que codificam para a proteína 53 (p53) e para a proteína do retinoblastoma 1 (RB1), a sua inibição leva à cessação dos normais mecanismos de sinalização que travam o crescimento de células anormais, permitindo que estas progridam. A p53 ajuda a manter a integridade dos mecanismos de reparação do ácido desoxirribonucleico (ADN) e promove a apoptose de células com lesões irreversíveis no seu material genético. Normalmente, estes genes supressores de tumores funcionam como antagonistas dos proto-oncogenes, numa rede que regula o crescimento celular. Contudo, as mutações nestes genes não são exclusivas do melanoma, tendo sido já detetadas em vários outros tumores caninos. Para além dos genes supressores de tumores já mencionados, são conhecidos muitos outros, entre os quais os inibidores das cinases dependentes de ciclinas (INK4a, INK4b) e Waf-1. As cinases dependentes de ciclinas (CDK) desempenham vários papéis na regulação da proliferação celular, tanto ao nível intrínseco do ciclo celular como em resposta a sinais extracelulares. Como tal, a diminuição ou cessação da produção de CDK, pode promover o desenvolvimento neoplásico (Modiano, Ritt & Wojcieszyn, 1999; Smith et al., 2002; Sulaimon & Kitchell, 2003; Argyle & Khanna, 2013; Westberg et al., 2013).

Por último, existe um outro requisito necessário para a progressão tumoral, o crescimento autónomo do tumor, promovido por oncogenes. Os oncogenes mais importantes codificam para fatores de crescimento como o fator de crescimento básico dos fibroblastos, a atividade estimuladora de crescimento do melanoma, algumas interleucinas – como a 8, a 10 e a 18 -, o fator de crescimento derivado das plaquetas - A, e a hormona estimuladora dos melanócitos. Para além dos fatores mencionados, no caso de melanomas em estadios avançados estes são estimulados por fatores adicionais, como a interleucina 6 e o fator de crescimento tumoral -  $\beta$  (Smith et al., 2002).

## **Metastização**

A capacidade das células neoplásicas se dissociarem do tumor primário e passarem por diversas barreiras estruturais e celulares é um pré-requisito fundamental para a metastização das células do MMO primário. Contudo, este é um processo complexo que requer a libertação das células neoplásicas das suas ligações adesivas intercelulares, afastando-se do normal microambiente celular, e a migração através da matriz de tecido conjuntivo em direção aos vasos sanguíneos e linfáticos. Uma vez no interior destes vasos, as células tumorais têm de fazer o processo inverso, ou seja, passar através da parede dos

mesmos até um novo órgão e estabelecer novas interações (Sulaimon & Kitchell, 2003; Modiano, 2013). No entanto, apesar de um grande número de células metastáticas conseguir entrar em circulação, poucas são as que originam metástases, isto é, tumores secundários (Sulaimon & Kitchell, 2003).

O processo de metastização decorre sequencialmente e inicia-se com a angiogénese e a aquisição de mecanismos de invasão das células de melanoma. Nesta primeira fase há uma diminuição da expressão de algumas moléculas de adesão e um aumento da expressão de outras moléculas de adesão, nomeadamente algumas integrinas. Estas fazem parte de uma grande família de recetores glicoproteicos da superfície celular que ligam o citosqueleto à matriz extracelular em locais de adesão focal (Cardoso, 2009). Consequentemente, torna-se possível a dissociação de clones metastáticos. A fase seguinte é caracterizada pela degradação da matriz extracelular devido à secreção de enzimas proteolíticas como as metaloproteinases, permitindo a migração dos clones metastáticos. O passo seguinte engloba a invasão intravascular, transporte e sobrevivência das células de melanoma em circulação nos vasos sanguíneos e linfáticos. Neste ambiente, os clones metastáticos estão sujeitos a uma intensa pressão de seleção, podendo ser destruídos por fatores mecânicos ou pelo sistema imunitário do próprio hospedeiro. Como tal, estas células têm de 1) modificar a estrutura do citoesqueleto (para se tornarem mais resistentes) e em simultâneo 2) expressar antigénios de superfície celular do próprio hospedeiro (para evadir o sistema imunitário). Por último, verifica-se a adesão de clones metastáticos ao endotélio vascular e a invasão extravascular em locais secundários. Aqui volta a verificar-se um aumento da expressão de moléculas de adesão e nova proliferação (Smith, et al., 2002; Sulaimon & Kitchel, 2003; Vieira, 2013; Modiano et al., 2013). No caso do MMO, os locais onde há maior incidência de metastização são linfonodos regionais e o pulmão, o qual constitui o ambiente ideal para a proliferação das células de melanoma. Outros locais que podem ser sede de metastização desta neoplasia são: fígado, cérebro, glândulas adrenais e rins (Smith, et al., 2002; Bergman et al., 2013; Biller et al., 2016).

A taxa de metastização do MMO é considerada elevada em comparação com outros tumores da cavidade oral. Segundo Braeuer et al. (2013), este facto é devido a várias alterações moleculares e genéticas que ocorrem durante o processo de metastização e que contribuem para o fenótipo maligno destas células tumorais, as quais são abaixo descritas:

- 1) As células de melanoma são altamente imunogénicas, isto é, na sua superfície apresentam vários antigénios reconhecidos pelos linfócitos T citotóxicos que identificam estas células como tumorais. No entanto, possuem também eficazes mecanismos de evasão à resposta imunitária do hospedeiro como, por exemplo, a secreção de citocinas inibidoras da resposta imunitária.

- 2) As células de melanoma partilham diversos antígenos de superfície com as células do endotélio vascular, os quais ajudam à sua adesão e, posteriormente, migração para locais secundários.
- 3) As células de melanoma são fortemente angiogénicas e linfangiogénicas devido à sua produção de moléculas inflamatórias como a interleucina 8 e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).
- 4) As células de melanoma possuem uma natureza mesenquimatosa, dado que os melanócitos derivam da crista neural. Desta forma, as suas junções com as células vizinhas não são tão fortes como as das células epiteliais e, conseqüentemente, são mais dinâmicas. Existe uma maior proporção de células de melanoma com capacidade metastática em comparação com as de outros tumores sólidos.
- 5) A vitalidade das células-tronco dos melanomas é superior à de outros tumores sólidos, permitindo uma maior intensidade de metastização.

## **Epidemiologia**

As neoplasias orofaríngeas são mais comuns em cães do sexo masculino, os quais têm 2,4 vezes mais risco de desenvolver este tipo de neoplasias do que as cadelas (Liptak & Withrow, 2013). Esta maior predisposição dos machos verifica-se também no caso particular do MMO. De facto, esta maior incidência em machos é semelhante ao que se verifica em medicina humana, onde o rácio macho/fêmea de casos de MMO é de 2-3:1 (Smith et al., 2002; Liptak & Withrow, 2013).

As raças mais predispostas para o desenvolvimento desta neoplasia são: Cocker Spaniel, Golden Retriever - nestas duas raças verifica-se uma maior prevalência de MMO labial em comparação com as restantes - Caniche Anão, Pequínês, Cão de Pastor da Anatólia, Setter Gordon, Chow Chow, Scottish Terrier, Boston Terrier, Airedale Terrier, Setter Irlandês, Chihuahua, Cão de Pastor Alemão e Boxer (MacEwen et al., 1999, Smith et al., 2002; Liptak & Withrow, 2013; Nishiya et al., 2016). A existência de predisposição racial no MMO sugere que exista uma suscetibilidade genética que aumente o risco de desenvolver esta neoplasia. Apesar de se desconhecer a razão exata para existirem umas raças mais afetadas que outras, pensa-se que, para além do maior risco genético, se deva também a uma maior intensidade de pigmentação da pele e mucosas. Esta última causa contrasta com o que se verifica em medicina humana, onde a incidência de MMO em indivíduos africanos ou afro-americanos é menor que a dos indivíduos caucasianos (Smith et al., 2002).

A idade média ao diagnóstico é de 11,4 anos, sendo que a maioria dos cães com MMO têm uma idade superior a 10 anos, variando entre os 1 e os 17 anos (Smith et al., 2002; Liptak & Withrow, 2013).



## **Sinais clínicos**

Os tumores da cavidade oral e da orofaringe, onde se inclui o MMO, têm diversas manifestações clínicas, entre as quais: halitose, disfagia, odinofagia, hipersíalía, salivação purulenta ou sanguinolenta, mobilidade ou perda dentária, hemorragia oral, edema da face, anorexia e perda de peso (Morris & Dobson, 2001; Freeman et al., 2003; Munday et al., 2016). Ocasionalmente, pode haver fraturas patológicas da mandíbula, normalmente associadas a uma extensa destruição do osso subjacente causada pela invasão tumoral do mesmo (Smith et al., 2002). A manifestação de dor oral, normalmente, ocorre nos estádios finais da doença (Requicha, 2010).

Para além dos sinais clínicos observados no local do tumor primário ainda não foram descritas quaisquer síndromes paraneoplásicas especificamente associadas aos tumores da cavidade oral e da orofaringe (Morris & Dobson, 2001).

## **Diagnóstico**

### Clínico

O diagnóstico clínico de MMO pode ser difícil devido à aparência variável destes tumores pois, apesar de a maioria das lesões apresentar cor negra, a intensidade de pigmentação pode ser marcadamente diferente consoante o caso (Ramos-Vara et al., 2000; Liptak & Withrow, 2013). No entanto, a pigmentação não é uma característica específica do MMO pois outras lesões neoplásicas (descritas no subcapítulo Microscópico) e não neoplásicas (como nevo melanocítico, tatuagem por tintas / grafites de lápis / amálgama, melano-acantoma) podem ser fenotipicamente semelhantes (Ramos-Vara et al., 2000; Smith et al., 2002; Kauzman, Pavone, Blanas & Bradley, 2004).

A palpação dos linfonodos regionais é também parte imprescindível num exame clínico de qualquer animal (Liptak & Withrow, 2013). Segundo Williams e Packer (2003), o tamanho dos linfonodos como critério para prever metastização tem uma sensibilidade de 70% e uma especificidade de 51%. Estes autores concluíram que, de facto, existe uma correlação significativa entre o tamanho dos linfonodos e o seu grau de invasibilidade por células tumorais. Contudo, esta associação não aparenta ser forte o suficiente para ser considerada clinicamente relevante. Como tal, a medição do diâmetro dos linfonodos por si só não é suficiente para fazer o estadiamento clínico do MMO, podendo ser causa de subdetecção de metástases (Williams & Packer, 2003; Bergman et al., 2013).

### Microscópico

O diagnóstico definitivo apenas é obtido através do exame microscópico de uma amostra representativa da lesão obtida por: colheita de células com recurso a PAAF – diagnóstico citológico – ou colheita de tecido através de biópsia – diagnóstico histológico (Morris & Dobson, 2001; Liptak & Withrow, 2013; Biller et al., 2016). No entanto, o facto de o MMO mimetizar microscopicamente outro tipo de neoplasias (como por exemplo, sarcoma, linfoma, mastocitoma, plasmocitoma, neoplasias histiocíticas e tumores osteogénicos) dificulta o diagnóstico microscópico (Ramos-Vara et al., 2000; Smith et al., 2002). Apesar de a citologia ser mais rápida e menos dispendiosa, a histologia é mais vantajosa pois, para além de fornecer informação relativa ao tipo de células presentes, permite também avaliar a arquitetura da lesão e o grau histológico de malignidade (Morris & Dobson, 2001; Spangler & Kass, 2006; Friedrichs & Young, 2013).

Dois dos critérios histológicos com maior valor preditivo do grau de malignidade em cães com MMO baseiam-se na determinação da proliferação tumoral através de marcadores celulares endógenos de proliferação como o índice mitótico e o marcador de proliferação celular Ki-67 (Ramos-Vara et al., 2000; Bergin, Smedley, Esplin, Spangler & Kuipel, 2011; Bergman et al., 2013). No caso específico do índice de imunomarcação com o Ki67 existe um valor de corte de Ki67 > 19,5. Este valor de corte tem uma sensibilidade e especificidade de 87,1% e 85,4%, respetivamente, na previsão de morte devida ao MMO no espaço de um ano após o diagnóstico inicial (Bergin et al., 2011).

Dada a elevada taxa de malignidade do MMO, os linfonodos regionais, para além da palpação, devem ser também sujeitos a uma análise citológica e/ou histológica para avaliar a presença de metástases (Smith et al., 2002; Bergman et al., 2013; Biller et al., 2016).

- Imuno-histoquímica

Como já foi referido, existem alguns casos de MMO que se assemelham microscopicamente a outros tipos de neoplasias, nomeadamente os amelanóticos que constituem cerca de um terço da totalidade dos casos (Smith et al., 2002; Liptak & Withrow, 2013). Como tal, foram desenvolvidas técnicas de imuno-histoquímica para ajudar a identificar estes casos particulares, alguns destes imunomarcadores incluem o S-100 ou o antigénio de melanoma reconhecido por células-T (Melan-A) específicos para melanoma (Smith et al., 2002; Liptak & Withrow, 2013). O Melan-A é o imunomarcador mais específico para o MMO, sendo, no entanto, menos sensível que os restantes (Ramos-Vara et al., 2000; Smith et al., 2002). Idealmente, deve ser utilizada uma combinação dos diferentes imunomarcadores existentes pois aumenta a probabilidade de deteção desta neoplasia (Ramos-Vara et al. 2000). Recentemente, foi criado um anticorpo murino monoclonal (IBF9), o primeiro imunomarcador

específico para um antígeno de melanoma canino com sensibilidade superior a 80% (Smith et al., 2002).

- Hibridização *in situ*

A hibridização *in situ* sendo uma técnica que é executada por um operador especializado e que necessita de um maior número de equipamentos pois utiliza uma sonda de ADN complementar para ácido ribonucleico mensageiro (ARN<sub>m</sub>) tirosinase específico, constitui uma ferramenta de diagnóstico altamente específica e sensível na identificação destes tumores (Smith et al., 2002). No entanto, não é uma técnica de uso rotineiro em medicina veterinária.

### Imagiológico

Os exames radiográficos, de TC e de ressonância magnética (RM) permitem avaliar a extensão tumoral total e, desta forma, planejar a cirurgia de exérese do MMO, principalmente quando a lesão é de grandes dimensões e/ou se localiza mais caudalmente; possibilitam ainda a deteção de lise óssea causada pelo tumor e de situações de metastização linfática e pulmonar (Hashemi-Pour, 2007; Liptak & Withrow, 2013; Biller et al., 2016).

### **Estadiamento**

O processo de estadiamento implica a determinação da extensão de uma neoplasia a nível local e à distância, isto é, a presença ou ausência de metástases nos linfonodos regionais ou em órgãos distantes (Morris & Dobson, 2001; Biller et al., 2016; Munday et al., 2016). O estadio tumoral é importante para a determinação do prognóstico e instituição de uma terapêutica adequada dado que um tratamento bem-sucedido passa pela erradicação de todas as células tumorais, a qual apenas pode ser alcançada quando se conhece a completa extensão do tumor (Biller et al., 2016).

O estadiamento clínico do tumor consiste na confluência de 3 três critérios de classificação do sistema tumor, linfonodos, metástases - TNM, adaptado por Owen em 1980: a avaliação do tumor primário (T), a avaliação dos linfonodos locais e regionais (N) e a presença de metástases disseminadas à distância (M) (Morris & Dobson, 2001; Bergman, 2007). Assim, existem 4 estadios clínicos de MMO (I, II, III e IV) baseados na classificação anatómica de tumores TNM (Tabela 1).



Tabela 1 - Classificação TNM da organização mundial de saúde (OMS) de neoplasias orais no cão (adaptado de Owen, 1980)

<b>T: tumor primário</b>	
T1	Tumor < 2 cm
T2	Tumor 2 - 4 cm
T3	Tumor > 4 cm
<b>N: linfonodos regionais</b>	
N0	Sem evidência de envolvimento dos linfonodos regionais
N1b	Evidência histológica/citológica de envolvimento em um dos linfonodos regionais
N2b	Evidência histológica/citológica de envolvimento de mais do que um linfonodo regional
N3	Linfonodos regionais "fixos"
<b>M: Metástases à distância</b>	
M0	Sem evidência de metástases à distância
M1	Evidência de metástases à distância
Estadio I	T1, N0, M0
Estadio II	T2, N0, M0
Estadio III	T3, N0, M0 ou qualquer T, N1b
Estadio IV	Qualquer T, N2b ou N3 e M0 ou qualquer T, qualquer N e M1

De facto, este sistema pode ser usado como um método para registrar com precisão a aparente extensão da doença no momento em que esta é diagnosticada. Associada a um conhecimento do comportamento clínico do MMO, esta informação pode ser utilizada para determinar o prognóstico de um animal, embora esta previsão não seja totalmente precisa e varie de acordo com a implementação do tratamento. Como tal, quando se relaciona o estadio clínico com o prognóstico, devem ser tidos em consideração três pontos: 1) há uma diferença entre o estadio clínico e o verdadeiro estadio patológico de um tumor, pois não é possível detetar extensões microscópicas ou depósitos tumorais; 2) existem outros fatores, para além do estadio clínico, que têm importância significativa para o prognóstico, nomeadamente a localização do tumor, assim como o seu tipo e grau histológico; 3) a implementação de uma estratégia terapêutica poderá modificar o prognóstico pelo que o estadiamento clínico é uma avaliação constante e mutável no tempo (Morris & Dobson, 2001).

No entanto, este sistema de estadiamento tem algumas imprecisões. Por exemplo, para um indivíduo ser incluído na categoria N0 não é necessário que haja evidência citológica ou histológica de que os linfonodos não se encontram metastizados. Desta forma, a frequência com que existem animais falsamente considerados como isentos de doença metastática nos linfonodos é superior ao que realmente se verifica (Biller et al., 2016). Como tal, os prognósticos de MMO com base no estadiamento clínico diferem consideravelmente de caso para caso, tendo sido proposto por Hahn, DeNicola, Richardson e Hahn, em 1994, um

sistema de estadiamento alternativo com base nas características histopatológicas do tumor. Esta classificação propõe 2 estadios baseando-se no facto de a resposta ao tratamento se correlacionar com as características clínicas e histológicas do tumor (dimensão, localização e índice mitótico). O atual modelo de estadiamento do MMO representa ainda outras limitações para além das já mencionadas. Em primeiro lugar, o tamanho do tumor não está padronizado e, como tal, um MMO de 1,8 centímetros (cm) sem metastização nos linfonodos é considerado como pertencendo ao estadio I tanto em cães de porte gigante como em cães de raças miniatura. Em segundo lugar, a aparência, grau e outros índices histológicos de melanomas não são tidos em conta na atual classificação da OMS para o MMO (Bergman, 2007).

Tendo em conta que o tumor é uma entidade tridimensional, todas as estruturas anatómicas que o rodeiam como é o caso das fáscias, músculos e ossos adjacentes devem ser examinadas para avaliar se há evidência de infiltração por células tumorais (Morris & Dobson, 2001; Munday et al., 2016). O grau de dificuldade em avaliar o tumor primário na sua totalidade depende, não só da sua localização, como também da sua acessibilidade. Assim, a avaliação do tumor primário implica a realização de um exame físico, raio-X, ecografia, biópsia, TC e/ou, eventualmente, RM. Em primeiro lugar, o exame físico deve incluir a determinação da localização do tumor primário e a sua relação com as estruturas anatómicas adjacentes, a medição da dimensão ou volume do mesmo, a avaliação da sua mobilidade relativamente aos tecidos que o rodeiam, e a observação da sua superfície (verificar a eventual presença de úlceras). Um tumor pouco móvel ou fixo muito provavelmente resulta da sua invasão nas estruturas adjacentes (Morris & Dobson, 2001; Liptak & Withrow, 2013; Biller et al., 2016).

A radiologia permite avaliar a eventual lise óssea provocada pelo tumor, apesar do facto de a lise óssea apenas ser detetável ao raio-X quando o osso perde uma porção considerável do seu conteúdo mineral (Liptak & Withrow, 2013). Como tal, e tendo em conta que a lise óssea causada pelo MMO varia consoante o caso, a TC constitui um exame imagiológico preferível relativamente ao raio-X pois evidencia a destruição do osso numa fase mais precoce e, para além disso, também é útil na avaliação das margens de osso e tecidos moles, especialmente nos casos em que a localização não favorece a exérese cirúrgica completa (Forrest, 2013; Biller et al., 2016).

A biópsia, para além de permitir a obtenção de um diagnóstico histológico, pode também ser útil na determinação da sua diferenciação e capacidade de invasão (Morris & Dobson, 2001, Liptak & Withrow, 2013).

No atual sistema de estadiamento da OMS para tumores sólidos (Owen, 1980) a avaliação dos linfonodos relativamente à invasão neoplásica dos mesmos baseia-se na sua

mobilidade ou aderência, PAAF ou biópsia, e de exames imagiológicos complementares (Munday et al., 2016). Os sinais clínicos indicativos de invasão dos linfonodos por células neoplásicas são: um aumento acentuado das suas dimensões, forma irregular, textura mais firme e ausência de mobilidade, embora uma linfadenopatia possa apenas ser uma consequência de uma hiperplasia reativa (Morris & Dobson, 2001). Desta forma, a PAAF ou a biópsia dos linfonodos são necessárias para a distinção entre uma linfadenopatia reativa e uma linfadenopatia neoplásica. Neste aspeto, a ecografia e a TC são exames imagiológicos úteis, nomeadamente, para examinar os linfonodos menos avaliáveis no exame físico e antes de uma cirurgia. Como tal, a PAAF dos linfonodos regionais (ipsilateral e contralateral devido à variabilidade nos padrões de drenagem linfática) deve ser sempre executada, quer exista linfadenopatia ou não (Williams e Packer, 2003; Biller et al., 2016). De facto, segundo um estudo desenvolvido por Williams e Packer (2003), numa amostra de cães com MMO metastizado nos linfonodos regionais 70% apresentavam linfadenopatia, mas 30% tinham os linfonodos de dimensões normais. Idealmente, a abordagem cirúrgica para avaliar a metastização nos linfonodos regionais deve permitir a exérese dos mesmos através de uma incisão única. Este procedimento pode ser realizado durante o episódio anestésico utilizado para a biópsia e realização de exames imagiológicos do tumor primário (Berg, 1998). A ecografia abdominal, como já foi referido, é também um importante exame complementar no estadiamento do MMO, dado que este tumor pode também metastizar nos linfonodos abdominais, no fígado e nas adrenais, entre outros locais (Bergman, 2007). A utilização de um mapa linfático com os linfonodos sentinela e o recurso à linfadenectomia têm provado ser benéficos para a determinação do diagnóstico e prognóstico no melanoma humano, não existindo estudos semelhantes para o cão (Bergman, 2007). Os linfonodos sentinela (LFNS) são os primeiros linfonodos a receber a drenagem linfática proveniente de uma neoplasia e, como tal, encontram-se sob maior risco de desenvolverem metástases (Lurie, Seguin, Schneider, Verstraete & Wisner, 2006). Sabe-se que no cão os maiores linfocentros que recebem a drenagem aferente da cabeça e pescoço diferem dos do Homem. A drenagem da cabeça do cão é realizada no linfocentro mandibular, o qual inclui o linfonodo bucal (se presente), o linfocentro parotídeo, e o linfocentro retrofaríngeo (Bezuidenhout, 2013; McDonough, 2017). Quando os LFNS não têm evidências de doença metastática então considera-se que a restante rede de vasos linfáticos também está livre de células metastáticas. Do mesmo modo, quando o exame dos LFNS permite concluir que têm metástases, então assume-se que os restantes linfonodos regionais possam também ter doença metastática (Lurie et al., 2006). Uma linfocintilografia de 24 horas ou realizada no próprio dia da cirurgia associada à localização intra-cirúrgica dos linfonodos com sondas portáteis gama e/ou com corante vital azul permite a identificação dos LFNS (Wong et al., 2001). Os linfonodos que apresentem uma elevada atividade detetada pelas sondas ou os que coram com o corante vital são sujeitos a exérese cirúrgica para posterior avaliação

microscópica. A junção destes dois protocolos permite obter uma precisão de detecção de metástases de cerca de 97% (Wong et al., 2001). As técnicas de localização de LFNS têm algumas desvantagens, tais como: a necessidade de administrar uma substância radioativa em redor da lesão tumoral, por vezes repetidamente; a utilização de equipamento especializado e de uso limitado como as sondas intracirúrgicas; a incapacidade de visualizar diretamente os linfonodos alvo a não ser que seja feita uma incisão; e a ambiguidade na determinação dos verdadeiros LFNS em determinados agregados de linfonodos causada pelo derrame de corante nos linfonodos adjacentes, por exemplo (Zanzonico & Heller, 2000; Haigh, Glass & Essner, 2000; Lurie et al., 2006).

A taxa de metastização do MMO depende da sua localização, dimensão e estadio clínico, verificando-se em quase 80% dos cães (Liptak & Withrow, 2013). Esta neoplasia metastiza por via linfática e hematogénica, sendo que a realização de radiografias torácicas (3 projeções - dorsoventral ou ventrodorsal, lateral direita e esquerda) para a detecção de metástases pulmonares deve ser um procedimento obrigatório para qualquer cão com suspeita de MMO (Morris & Dobson, 2001; Munday et al., 2016). Contudo, a detecção de metástases constitui um desafio pois estas só atingem dimensão suficiente para serem detetadas nos exames complementares de diagnóstico quando o tumor se encontra num estadio já avançado. De facto, a detecção de nódulos pulmonares numa radiografia apenas é possível quando estes medem pelo menos 5 milímetros de diâmetro (Johnson & Wisner, 2007; Kealy, 2011; Dias, 2012; Alexander et al., 2012). Assim, a não detecção de metástases pulmonares nas radiografias torácicas não exclui a possibilidade de existirem micrometástases. Como já foi referido, também outros órgãos como o fígado, o baço ou os rins podem estar metastizados, sendo que a distribuição das metástases pode ser difusa ou nodular. Deste modo, a silhueta destes órgãos pode não apresentar alterações ao raio-X num estadio inicial e assim, nestas situações, a ecografia é considerado o exame imagiológico mais útil para a avaliação dos órgãos internos, exceto para os pulmões (Morris & Dobson, 2001). De acordo com um estudo conduzido por Boston et al. (2014) com uma amostra de 151 cães com MMO, 35 em 90 (38,9%) apresentavam metástases pulmonares e 28 em 90 (31,1%) evidenciavam metástases nos linfonodos.

## Tratamento

O tratamento de um animal oncológico depende da natureza e extensão da sua doença. Assim, para este ser bem-sucedido, o tipo e grau histológico do MMO, bem como o seu volume e extensão anatômica devem ser definidos antes de se iniciar qualquer terapêutica. É também importante detetar possíveis complicações hematológicas ou metabólicas relacionadas com a doença e investigar se há doenças concomitantes, dado que todos estes fatores podem influenciar o método de tratamento e o prognóstico. O objetivo de qualquer tratamento é sempre a cura, ou seja, a erradicação de todas as células estaminais tumorais. No entanto, esta nem sempre é alcançável mesmo com os métodos terapêuticos avançados que estão atualmente disponíveis. A decisão de tratar um animal oncológico deve ser tomada, em simultâneo, pelo médico veterinário e pelo seu tutor informado da natureza da doença, do prognóstico e das possíveis opções de tratamento (Morris & Dobson, 2001; Biller et al., 2016).

Durante o simpósio da VSSO (*Veterinary Society of Surgical Oncology*) realizado em 2016, o MMO foi discutido por diversos médicos veterinários com interesse em cirurgia oncológica. Desta discussão foram obtidas diretrizes clínicas, nomeadamente em relação ao tratamento desta neoplasia. A terapêutica recomendada para o MMO inclui a nível local a exérese cirúrgica com intenção curativa ou radioterapia (ou ambas), e ainda terapia adjuvante a nível sistémico. Apesar do tratamento local através de cirurgia com margens amplas associada, ou não, a radioterapia estar correlacionado com uma boa taxa de sucesso, a doença metastática continua a constituir a principal causa de morte. Antigamente, a terapia adjuvante administrada após a cirurgia consistia num protocolo de quimioterapia com compostos platinados, o qual não gerava resultados satisfatórios nem consistentes. Mais recentemente, o VEGF tem mostrado ser um possível alvo para o tratamento adjuvante do MMO, assim como a quimioterapia metronómica e a utilização de inibidores dos recetores da tirosina cinase (London et al., 2012; Tuohy, Selmic, Worley, Ehrhart & Withrow, 2014; Biller et al., 2016). De facto, todas estas alternativas terapêuticas podem desempenhar um papel importante no controlo sistémico da doença. Além disto, foi recentemente disponibilizada uma vacina para uso em cães com indicação para ser utilizada após tratamento cirúrgico ou radioterapia. Não existe, no entanto, qualquer consenso em relação ao protocolo de terapia adjuvante a utilizar no período pós-operatório em cães com MMO e não existe evidência de vantagens na utilização de algum tratamento adjuvante em particular (Boston et al., 2014; Biller et al., 2016).

### Cirúrgico

A cirurgia é, de facto, o método terapêutico mais eficaz e de eleição para o MMO, principalmente nos estadios iniciais, permitindo o controlo local da doença (Berg, 1998; Bergman et al., 2013; Boston et al., 2014). No entanto, esta pode estar contra-indicada em casos de risco anestésico ou cirúrgico, risco de disfunção pós-operatória grave ou quando existam metástases disseminadas sistemicamente, optando-se nesses casos por tratamentos paliativos médicos (Bergman, 2007). A cirurgia, para além de ser mais eficaz, como já foi referido, tem também a vantagem de ser rápida e de ter menos custos que outros tratamentos disponíveis. Apesar de o tipo de cirurgia depender da localização tumoral, o envolvimento ósseo é uma característica comum do MMO e, como tal, a exérese completa implica frequentemente a realização de exéreses em bloco que incluem osso, tais como mandibulectomias ou maxilectomias (Liptak & Lascelles, 2012). As margens cirúrgicas devem ser sempre que possível amplas com 2 a 3 centímetros de tecido aparentemente saudável na periferia do tumor (Morris & Dobson, 2001; Liptak & Lascelles, 2012). Contudo, em alguns casos podem ocorrer dificuldades no encerramento da ferida cirúrgica, podendo ser necessário recorrer às técnicas reconstrutivas (Liptak & Lascelles, 2012). Atualmente, estão descritas diversas técnicas cirúrgicas para MMO e outros tumores orais (Kosovsky, Matthiesen, Marretta & Patnaik, 1991; Wallace, Matthiesen & Patnaik, 1992; Freeman et al., 2003; Liptak & Lascelles, 2012).

O pós-operatório da maioria dos casos é caracterizado por uma reduzida incidência de complicações e pelo rápido retorno da função mastigatória (Berg, 1998). Apesar destes procedimentos poderem suscitar alguma relutância por parte dos tutores, as consequências cosméticas dos mesmos são mínimas e, como tal, uma boa preparação e informação é essencial (Esplin, 2008).

A facilidade com que se obtêm as margens cirúrgicas recomendadas está bastante dependente da localização anatómica do tumor, mas também do tipo de tecidos que se encontra adjacente à lesão. De um modo geral, a exérese marginal está contra-indicada, exceto nos casos em que se considera a realização de um protocolo radioterapêutico no período pós-operatório, uma vez que estas técnicas estão associadas a elevadas taxas de recidiva local (Berg, 1998; Boston et al., 2014).

Apesar de as taxas de recidiva serem superiores em tumores retirados com margens incompletas do que nos que são excisados com margens limpas, os tutores devem ser sempre informados acerca das seguintes possibilidades: um tumor retirado com margens incompletas pode nunca mais recidivar ou, pelo contrário, um tumor cujo relatório de histopatologia indica que foi retirado com margens completas pode ainda assim recidivar localmente. Desta forma o animal deve ser cuidadosa e regularmente vigiado durante o

período pós-operatório. Perante um relatório de histopatologia que refira margens incompletas pode-se optar, imediatamente, pela realização de uma excisão ampla da cicatriz cirúrgica ou considerar a realização de um protocolo de radioterapia durante o período pós-operatório (Esplin, 2008; Biller et al., 2016).

O tempo médio de sobrevivência de cães com MMO sujeitos apenas tratamento cirúrgico é em média de 352 dias, não se verificando qualquer acréscimo no tempo de sobrevivência quando são utilizadas terapias adjuvantes (Boston et al., 2014).

### Médico

- Quimioterapia

De acordo com a literatura veterinária, a quimioterapia sistémica para o tratamento do MMO não tem tido resultados promissores (Brockley, Cooper & Bennett, 2013; Boston et al. 2014; Tuohy et al., 2014). Vários agentes quimioterápicos foram já testados para o efeito como a mitoxantrona, doxorrubicina, dacarbazina, carboplatina e cisplatina (Berg, 1998; Rassnick, et al., 2001; Boria, et. al., 2004). Relativamente ao tratamento quimioterápico local existem algumas modalidades praticadas, apesar de pouco difundidas, como o implante intralesional de cisplatina, a injeção intralesional de bleomicina associada a eletroquimioterapia, entre outras (Bergman, 2007). A quimioterapia tem, contudo, revelado resultados inconsistentes estimando-se que a resposta à mesma não vá além dos 8-28%, não existindo evidência de que, de facto, aumente o tempo de sobrevivência (Boston et al., 2014). De um modo geral, as taxas de sucesso são baixas e nos casos em que há respostas positivas ao tratamento estas são, geralmente, de curta duração (Bergman et al., 2013).

- Imunoterapia

O MMO é um tumor altamente imunogénico e, como tal, é expectável que responda à imunoterapia através da indução de respostas antitumorais com intensidade suficiente para provocar a regressão do tumor (Dow et al., 1998; Liptak & Withrow, 2013).

Atualmente existe uma vacina de ADN disponível no mercado licenciada para uso veterinário - Oncept<sup>™</sup>, Merial<sup>®</sup>, Duluth, GA, USA - cujo plasmídeo contém o gene humano que codifica para uma proteína de membrana – a tirosinase (Bergman & Wolchok., 2008; Bergman et al., 2013; Treggiari, Grant & North, 2016). Esta vacina xenogeneica tem a vantagem de conter ADN de outra espécie, o que potencia as suas capacidades imunogénicas, auxiliando na indução de anticorpos e linfócitos T citotóxicos específicos contra o antígeno tumoral (a tirosinase) (Bergman et al., 2003; Bergman et al., 2013; Treggiari et al., 2016).

Contudo, apesar de a imunoterapia ser promissora no tratamento, prevenção e controlo de metástases do MMO, o qual é uma neoplasia altamente agressiva, a taxa de sucesso vai

depende da combinação desta com outras modalidades terapêuticas como, por exemplo, a radioterapia e a quimioterapia (Biller et al., 2016).

- Radioterapia

O MMO responde positivamente à radioterapia, a qual permite obter um excelente controlo local da doença quando utilizada para tratar volumes tumorais de dimensões microscópicas resultantes de uma incompleta exérese cirúrgica, por exemplo (Blackwood & Dobson, 1996; Berg, 1998; Freeman et al., 2003; Bergman et al., 2013; Biller et al., 2016). Esta pode ter como objetivo a cura, ou seja, a erradicação de todas as células tumorais viáveis existentes ou ser apenas paliativa, no sentido de melhorar a qualidade de vida e minimizar o desconforto do animal (Bergman et al., 2013). De um modo geral, o MMO responde melhor a protocolos de radioterapia baseados numa dose elevada por fração, em oposição aos protocolos onde é utilizada uma dose por fração mais reduzida mas cuja dose total de tratamento é mais elevada (Freeman et al., 2003; Biller et al., 2016). Esta característica deve-se ao facto de as curvas de sobrevivência das células de melanoma, isto é, a relação entre a dose de radiação e a percentagem de células que sobrevivem, terem um grande limiar antes de atingirem a morte celular exponencial. Este facto permite supor que estas células têm uma grande capacidade para acumular e, possivelmente, reparar danos subletais causados pela radioterapia (Freeman et al., 2003; Weltman, 2009; Lagos, 2013).

Apesar de a radioterapia ser considerada um tratamento seguro e eficaz no tratamento do MMO, implica a utilização de equipamento e instalações especializados. Estes apresentam custos elevados de instalação e manutenção e, como tal, o uso de radioterapia em animais é restrita a grandes centros de referência, não existindo atualmente nenhum do género em Portugal.

#### Outros tratamentos

Existe um relato da administração de injeções locais e sistémicas de lupeol - um triterpeno (pertencente à classe dos terpenos) – que promove a diferenciação de células de melanoma e suprime o crescimento tumoral em cães com MMO (Itoh et al., 2014). Neste estudo, um cão com MMO em estadio III de acordo com a classificação da OMS foi sujeito a 4 tratamentos distintos: hipertermia, injeções com lupeol, terapia com células dendríticas e, por fim, a administração oral de extratos de *Cordyceps sinensis* (Monolis Inc., Saitama, Japão), não tendo sido efetuada cirurgia, radioterapia nem quimioterapia.



## **Seguimento**

Durante o primeiro ano após a exérese cirúrgica de um MMO o local de incisão deve ser inspecionado a cada 3 a 4 meses para que caso surja uma eventual recidiva local, esta seja detetada precocemente. O aparecimento de recidivas após o período de um ano é considerado um acontecimento improvável (Berg, 1998). De facto, num estudo conduzido por Esplin (2008) os cães que sobreviveram 6 meses após a cirurgia com intenção curativa sem problemas relacionados com o tumor eram então considerados como tendo um curso clínico favorável. Como tal, quando ocorrem recidivas durante o ano de seguimento estas devem ser tratadas com cirurgia agressiva e/ou radioterapia. Também a cada 3 a 4 meses devem ser obtidas radiografias torácicas para controlar o possível desenvolvimento de doença metastática. No entanto, as metástases pulmonares com dimensão suficiente para serem visíveis ao exame radiográfico já dificilmente respondem à quimioterapia (Berg, 1998).

## **Prognóstico**

Os melanomas localizados na cavidade oral e nas junções mucocutâneas (à exceção dos da pálpebra) têm, de um modo geral, um comportamento maligno. No entanto, há várias características de um MMO associadas a um pior prognóstico (Smith et al., 2002; Bergman et al., 2013).

O estadio é um fator prognóstico, como referido anteriormente, dado que quanto mais avançado for, maior é a probabilidade de existirem metástases disseminadas e, como tal, está associado a um menor tempo de sobrevida livre de doença e tempo de sobrevida global (Liptak & Withrow, 2013; Tuohy et al., 2014).

O volume tumoral está também associado a um pior prognóstico (Hahn et al, 1994; Boston et al., 2014; Tuohy et al., 2014). Existe a suspeita de que há uma associação subjacente entre a duração da neoplasia e a existência de metástases pois, presumivelmente, as lesões tumorais de maiores dimensões passam despercebidas ou por tratar durante um maior período de tempo do que as de menores dimensões. Como tal, pensa-se que exista uma maior probabilidade de estes tumores já se encontrarem metastizados aquando do diagnóstico e início do tratamento (Boston et al., 2014). Uma outra hipótese que ajuda a explicar esta correlação é o facto de quanto maior for o volume tumoral, maior é a heterogeneidade do mesmo e, desta forma, maior é o risco de se desenvolverem clones metastáticos (Proulx et al., 2003). Por último, pensa-se ainda que um maior volume tumoral implica que exista uma menor probabilidade de controlo da doença e, por isso, de cura, necessitando de uma maior dose cirúrgica (Boston et al., 2014). O aumento de 1 centímetro

no diâmetro de um MMO estava correlacionado com um acréscimo de 32% na probabilidade de ocorrência de metástases ou recidiva local do tumor e com um aumento de 29% do risco de morte devido a esta doença no trabalho levado a cabo por Tuohy e colaboradores em 2014.

A localização da lesão e as margens cirúrgicas são também fatores com valor prognóstico que se relacionam entre si pois os casos mais acessíveis cirurgicamente, como os que se localizam na mandíbula rostral ou na maxila caudal, permitem margens mais amplas e, como tal, estão associados a um maior tempo de sobrevivência e a um melhor prognóstico (Hahn, et al., 1994; Bergman et al., 2013). O facto de os tumores localizados rostralmente estarem associados a um prognóstico mais favorável pode também ser devido ao facto de estas lesões estarem mais visíveis, permitindo uma deteção mais precoce pelos tutores e médicos veterinários. Para além disso, as porções caudais da maxila e da mandíbula têm uma rede vascular mais extensa e desenvolvida do que as porções rostrais, o que significa que os MMO localizados mais caudalmente têm, de um modo geral, uma maior capacidade de invasão dos tecidos da sua periferia e uma maior probabilidade de metastização (Wallace et al., 1992; Smith et al., 2002; Proulx et al., 2003; Bergman, 2007; Tuohy et. al., 2014). No entanto, de acordo com os resultados de Tuohy et al., 2014, não há relação entre a localização e o comportamento biológico do MMO e desde que se consiga obter margens amplas quando se realiza exérese cirúrgica das lesões localizadas caudalmente ou das que se encontram aderentes à maxila ou mandíbula o prognóstico não difere do das lesões mais rostrais ou localizadas apenas nos tecidos moles (sem invasão óssea).

Os casos que sejam consequência de uma recidiva após tratamento cirúrgico ou radioterapia estão também associados a um pior prognóstico (Liptak & Withrow, 2013).

Por fim, no que diz respeito à histopatologia, o índice mitótico, a atipia nuclear, o grau de pleomorfismo celular e nuclear, o nível de inflamação linfocítica profunda e de necrose intralesional, a reação do estroma, o grau de invasão, entre outros, proporcionam informação adicional ao prognóstico, existindo uma relação entre uma maior diferenciação e um melhor prognóstico (Spangler & Kass, 2006; Esplin, 2008; Tuohy et. al., 2014).

## **Valor prognóstico do volume tumoral total no melanoma maligno oral canino – Estudo retrospectivo**

### **Objetivos**

O presente estudo teve como objetivo contribuir para o conhecimento de fatores de prognóstico do MMO, averiguando a influência do volume total do tumor na ocorrência de metastização local e distante.

Os objetivos específicos incluíram:

- 1 - Determinar o volume global de tumor ajustado para o tamanho do animal através de um rácio crânio-tumoral;
- 2 - Avaliar a existência de alguma associação entre o rácio crânio-tumoral e a sobrevida global;
- 3 - Averiguar a existência de alguma correlação entre o rácio crânio-tumoral e a ocorrência de metástases pulmonares e nos linfonodos cervicais no momento do diagnóstico.

### **Materiais e métodos**

O estudo foi realizado com base na recolha retrospectiva de todos os casos de cães com MMO diagnosticados no Hospital Escolar Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (HEV), no Hospital Veterinário de Berna (HVB) e no Hospital Veterinário do Oeste (HVO), de agosto de 2011 a janeiro de 2018. No total foram conseguidos 16 casos.

#### Critérios de inclusão

Os animais incluídos no estudo obedeceram aos seguintes critérios de inclusão: diagnóstico citológico e/ou histológico de MMO, estadiamento de acordo com a classificação TNM da OMS adaptado (Owen, 1980) por TC de crânio e radiografia ou TC de tórax, e existência de registos clínicos.

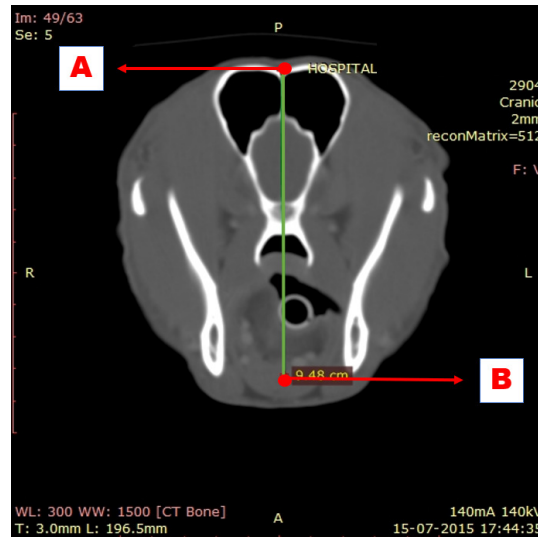
#### Volume tridimensional do tumor primário e do crânio

O cálculo do volume tridimensional do tumor primário (VTP) e do crânio (VTC), baseia-se num modelo cúbico, que permite obter um volume aproximado da “caixa” do tumor e da “caixa” craniana. Para o efeito, são visualizados cortes tomográficos axiais, sagitais e coronais médios.

As medidas colhidas para o cálculo do VTC são:

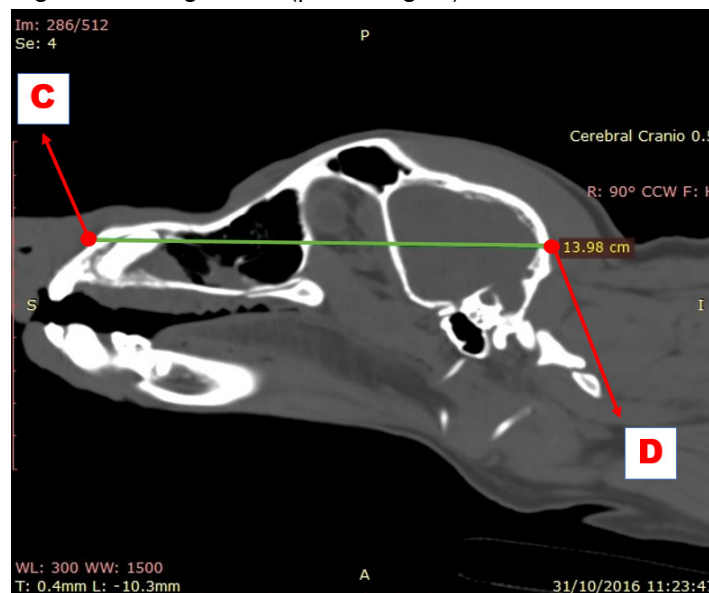
- No plano axial: a distância entre a fossa do osso frontal (*fossa frontalis*) - ponto A - e o ponto médio da linha virtual que vai desde a extremidade do corpo da mandíbula esquerda à extremidade do corpo da mandíbula direita - ponto B (Fig. 1);

Figura 1 - Imagem TC (plano axial)



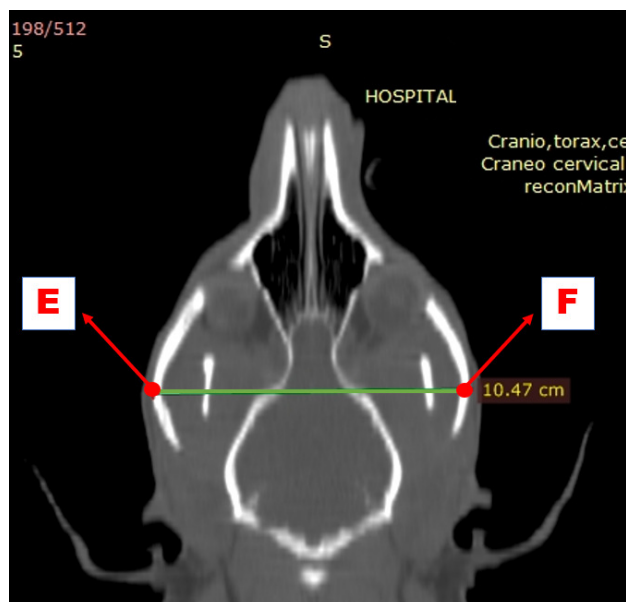
- No plano sagital: a distância entre o processo nasal (*processus nasalis*) do osso incisivo - ponto C - e a linha perpendicular à face mais externa do osso occipital – ponto D (Fig. 2);

Figura 2 - Imagem TC (plano sagital)



- No plano coronal: a maior distância entre os arcos zigomáticos esquerdo - ponto E -

Figura 3 - Imagem TC (plano coronal)



e direito – ponto F (Fig. 3).

O cálculo do VTP resultou da multiplicação das 3 distâncias correspondentes aos eixos

Figura 4 - Imagens TC com medidas do tumor, posteriormente utilizadas no cálculo do VTP



tridimensionais da “caixa” do tumor (Fig.4).

Todas as medições foram efetuadas em centímetros e o cálculo dos volumes foi realizado em centímetros cúbicos, respectivamente, arredondados às milésimas.

#### Rácio crânio-tumoral

O rácio crânio-tumoral consiste na razão entre o VTC e o VTP de cada animal, arredondada às décimas.



### Análise estatística

A recolha de dados foi feita a partir do historial clínico de cada animal disponível no WinVet e Bizagi (HVB), no QVET (HEV) e cedido diretamente pelo HVO. Estes dados foram trabalhados numa folha de cálculo do Microsoft Excel (Microsoft® Office 365). Neste programa procedeu-se ainda à análise descritiva das variáveis quantitativas e nominais da amostra.

Considerou-se como variável quantitativa discreta a idade e como variáveis quantitativas contínuas o VTP, VTC, rácio C-T e o tempo de sobrevida global. As variáveis quantitativas foram analisadas relativamente à média, desvio padrão, mediana, valor mínimo e máximo. As variáveis qualitativas nominais consideradas foram o sexo, a classificação citológica/histológica do melanoma (melanótico/ amelanótico), localização anatómica do tumor dentro da cavidade oral, raça, e a presença/ ausência de metastização no momento do diagnóstico. Como variável qualitativa ordinal considerou-se o estadio TNM (Owen, 1980). Todas as variáveis nominais foram avaliadas em relação à sua frequência e expressas em percentagem.

O teste não paramétrico U de Mann-Whitney foi a análise estatística escolhida para averiguar a existência de correlação entre o rácio crânio-tumoral e a ocorrência de metástases pulmonares e nos linfonodos cervicais no momento do diagnóstico. A escolha deste teste baseou-se no facto de não existir normalidade associada, de o rácio C-T ser uma variável quantitativa e de os dois grupos (grupo 1 - animais sem metástases no momento do diagnóstico *versus* grupo 2 - animais com metástases no momento do diagnóstico) serem independentes. Assim, para efetuar esta análise foi utilizado o programa de análise estatística MedCalc Statistical Software (versão 16.4.3; MedCalc Software bvba, Ostend, Bélgica).

A curva Característica de Operação do Receptor (ROC) foi a análise de poder discriminativo escolhida para a obtenção de um ponto de corte para o rácio C-T como índice prognóstico do MMO, utilizando o programa IBM® SPSS® Statistics (IBM SPSS Statistics 22, 2013). O poder discriminativo corresponde à área sob a curva (AUC - *Area Under the Curve*), sendo que à medida que esta se aproxima de 1 mais discriminante é o fator prognóstico.

Em relação à avaliação da existência de alguma associação entre o rácio C-T e a sobrevida global, foi realizada uma análise de sobrevivência com recurso ao teste de Kaplan-Meier, utilizando o programa de análise estatística MedCalc Statistical Software (versão 16.4.3; MedCalc Software bvba, Ostend, Bélgica). Foram censurados os animais que morreram na sequência de outra causa não relacionada com o tumor, os que deixaram de ser seguidos nos respetivos centros de atendimento médico-veterinários (CAMVs) e aqueles que se encontravam vivos no final do estudo.

O intervalo de confiança utilizado neste estudo foi de 95%, isto é, apenas valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## **Resultados**

### Caracterização da amostra

Foram incluídos neste estudo 16 cães, 10 machos (62,5%) e 6 fêmeas (37,5%), com uma média de idades de 11,69 anos (intervalo de confiança - IC 95% [10,56 - 12,82], desvio padrão ( $\sigma$ ) = 2,30) (Anexo 1). Sete cães não tinham raça definida (43,75%) e 9 eram de raça definida (56,25%) dos quais 3 Cocker Spaniel (18,75%), 2 Caniche Anão (12,50%), 1 Spitz Alemão Anão (6,25%), 1 Cão de Água Português (6,25%), 1 Pequinês (6,25%) e 1 Retriever do Labrador (6,25%). Verificou-se que 5 cães (31,25%) eram de porte médio-grande - > 15 quilogramas (kg) - e 11 cães (68,75%) eram de porte pequeno - < 15 kg. Registaram-se 4 casos (25%) que eram recidivas de MMO, sendo os restantes 12 casos (75%) registados como primeira apresentação da doença.

A localização do MMO dentro da cavidade oral variou entre 3 regiões anatómicas (lábio, maxila e mandíbula) e 2 regiões topográficas (rostral - tumores rostrais ao 2º dente pré-molar - e caudal - tumores caudais ao 2º dente pré-molar): 1 no lábio (6,25%); 8 na mandíbula (50%) – sendo que 2 (12,5%) eram na mandíbula rostral e 6 (37,5%) na mandíbula caudal; e 7 na maxila (43,75%) – dos quais 2 (12,5%) na maxila rostral e 5 (31,25%) na maxila caudal. A maioria dos casos ( $n=15$ ; 93,75%) foram observados na gengiva maxilar ou mandibular e um caso no lábio ( $n=1$ ; 6,25%).

Dos 16 casos, 2 (12,5%) foram classificados histologicamente como amelanóticos.

Todos os MMO foram agrupados em 4 estadios clínicos (Owen, 1980), 1 (6,25%) foi classificado como estadio I, 4 (25%) como estadio II, 4 (25%) como estadio III e 7 (43,75%) como estadio IV. Registou-se a presença de metástases nos linfonodos regionais (N1b, N2b ou N3) em 8 casos (50%) e à distância (M1) em 3 casos (18,75%).

Dentro de cada estadio do sistema TNM, os animais foram agrupados em 7 classes diferentes (T1N0M0, T1N1M1, T2N0M0, T2N0M1, T2N1M0, T3N0M0 e T3N1M0) resumidos no Gráfico 1. Em 3 casos (18,75%), o eixo maior do tumor era inferior a 2cm (T1), sendo que 1 caso (6,25%) apresentava metástases nos linfonodos mandibulares (N2b) e à distância (M1) e os outros 2 (12,5%) não (N0 e M0).

Nove casos (56,25%) apresentavam um tumor cujo eixo maior se encontrava no intervalo de 2 a 4 cm (T2). Destes, 4 casos (25%) não apresentavam metástases (N0 e M0), 3 (18,75%) tinham metástases em ambos os linfonodos mandibulares (N2b) e não tinham metástases sistémicas (M0), um caso (6,25%) tinha apenas metastização no ipsilateral (N1b e M0), e

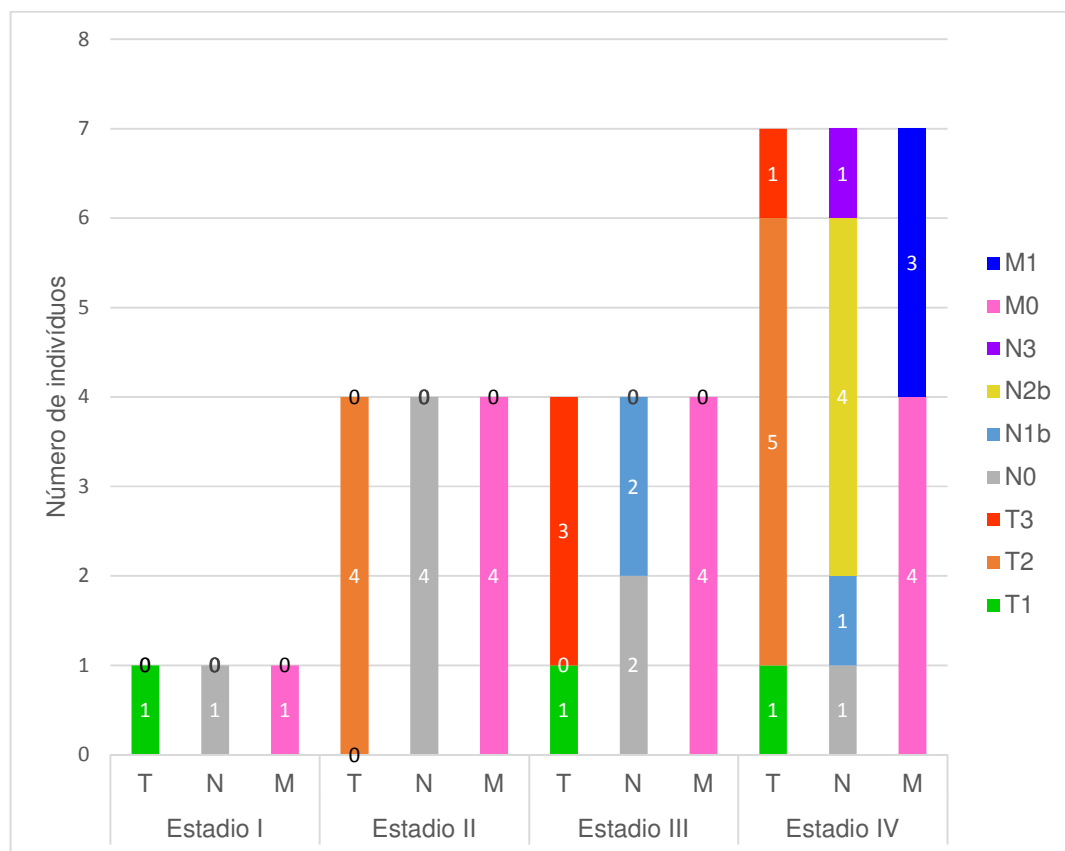


um animal (6,25%) tinha metastização no linfonodo mandibular ipsilateral (N1b) e a nível sistêmico (M1).

Registaram-se 4 casos (25%) com um tumor de eixo maior superior a quatro centímetros (T3), dos quais 1 (6,25%) tinha um linfonodo mandibular “fixo” (N3), outro (6,25%) tinha metástases no linfonodo mandibular ipsilateral (N1b) e os restantes 2 (12,5%) não (N0). Destes (n=4; 25%), nenhum tinha evidência de metastização à distância (M0).

O gráfico 1, abaixo representado, resume a distribuição de estádios T (1 a 3), N (0,1b,2b,3) e M (0 e 1) de acordo com o sistema TNM (Owen, 1980).

Gráfico 1 - Estadiamento clínico dos indivíduos do estudo



#### Volume do Tumor Primário (VTP)

Os valores registados para o VTP oscilaram entre 0,155 e 52,8 centímetros cúbicos (cm<sup>3</sup>). A mediana calculada para esta variável foi de 17,04 cm<sup>3</sup> (IC 95% [8,48 – 25,6], desvio padrão ( $\sigma$ ) = 17,46).

### Volume Tridimensional do Crânio (VTC)

Os valores registados para o VTC oscilaram entre 391,63 cm<sup>3</sup> e 3347,977 cm<sup>3</sup>. A mediana calculada para esta variável foi de 1087,51 cm<sup>3</sup> (IC 95% [887,47 – 1632,43], desvio padrão ( $\sigma$ ) = 760,17).

### Rácio Crânio-Tumoral (C-T)

O menor rácio C-T calculado foi 11 e o maior foi 11910, tendo sido registada uma mediana de 78,5 (IC 95% [-269 – 2785],  $\sigma$  = 3116). Devido à forte dispersão dos dados obtidos, isto é, à heterocedasticidade, optou-se pela transformação logarítmica dos mesmos, a qual é representada na tabela 2.

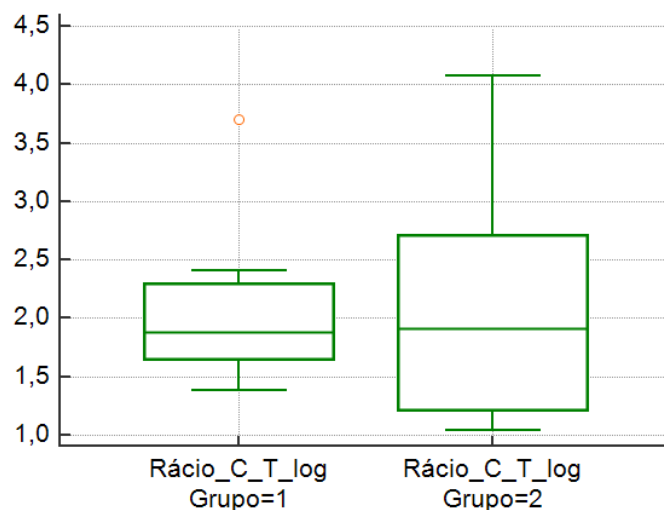
Tabela 2 - Transformação logarítmica do rácio C-T

Animal	Rácio C-T	logRácio C-T
1	94	1,973
2	317	2,501
3	38	1,580
4	255	2,407
5	11910	4,076
6	11	1,041
7	25	1,398
8	75	1,875
9	17	1,230
10	1788	3,252
11	15	1,176
12	5064	3,704
13	82	1,914
14	342	2,534
15	73	1,863
16	24	1,380

### Rácio C-T e metastização linfática e sistêmica

Dos 16 casos, 8 (50%) tinham metastização linfática e 3 (18,75%) tinham metastização pulmonar. Do total, 7 (43,75%) cães não tinham quaisquer sinais de metastização e 9 (56,25%) tinham evidência de metastização linfática e/ou sistêmica. A avaliação da eventual correlação entre o rácio C-T foi feita com base num gráfico de bigodes resultante do teste U de Mann-Whitney

Gráfico 2 - Gráfico de bigodes resultante do teste U de Mann-Whitney



Legenda: Grupo 1 - cães com MMO não metastizado;  
Grupo 2 - cães com MMO metastizado linfática e/ou sistemicamente

Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas nos valores do rácio C-T entre cães com MMO metastizado (grupo 2) e não metastizado (grupo 1) (nível de significância -  $p=0,9182$ ).

### Valor preditivo do rácio C-T para a metastização nos linfonodos cervicais

Em relação à curva ROC do rácio C-T para a metastização linfática (estado positivo =1), obteve-se uma AUC de 0,641 e um  $p > 0,05$  (gráfico 3) o valor de rácio C-T que obteve melhor correlação sensibilidade/especificidade foi 88 (tabela 3).

Tabela 3 - Relação sensibilidade/especificidade para diferentes valores de rácio C-T relativamente à metastização nos linfonodos cervicais

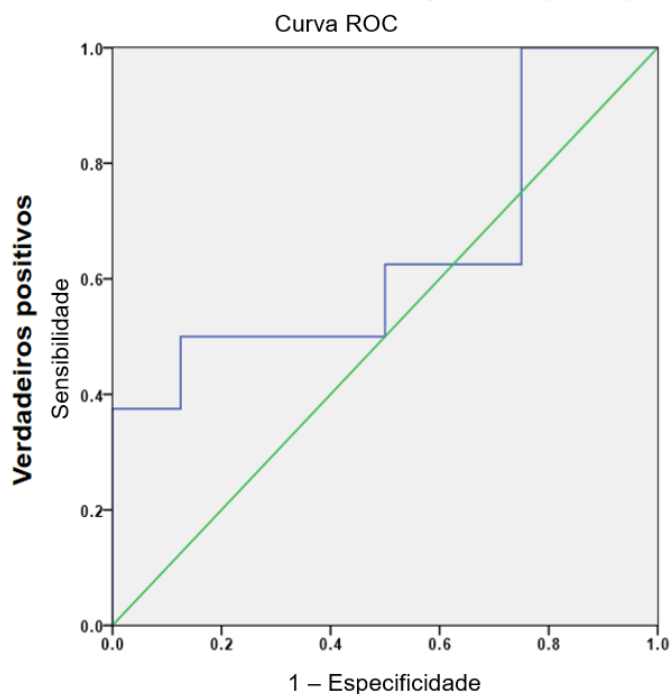
**Coordenadas da curva**  
**Variáveis do teste: Rácio C-T**

Positivo se menor ou igual a (a)	Sensibilidade	1 - Especificidade
10.00	.000	.000
13.00	.000	.077
16.00	.333	.077
20.50	.333	.154
24.50	.333	.231
31.50	.333	.308
55.50	.333	.385
74.00	.333	.462
78.50	.333	.538
→ 88.00	.333	.615
174.50	.333	.692
286.00	.333	.769
329.50	.333	.846
1065.00	.333	.923
3426.00	.667	.923
8487.00	.667	1.000
11911.00	1.000	1.000

Legenda: a – O menor valor de corte é o valor mínimo de teste observado menos 1, e o maior valor de corte é o valor máximo de teste observado mais 1. Todos os outros valores de corte correspondem às médias de dois valores de teste consecutivamente ordenados.

Gráfico 3 - Curva ROC do rácio C-T relativamente à metastização linfática

**Rácio C-T / AUC = 0,641; p = 0,345 (> 0,05)**



Legenda: AUC – “area under the curve”

### Valor preditivo do rácio C-T para a metastização nos pulmões

Em relação à curva ROC do rácio C-T para a metastização pulmonar (estado positivo =1), obteve-se uma AUC de 0,333 e um  $p > 0,05$  (gráfico 4). O valor de rácio C-T que obteve melhor correlação sensibilidade/especificidade foi 16 (tabela 4).

Tabela 4 - Relação sensibilidade/especificidade para diferentes valores de rácio C-T relativamente à metastização nos pulmões

<b>Coordenadas da curva</b>		
<b>Variáveis do teste: Rácio C-T</b>		
<b>Positivo se menor ou igual a (a)</b>	<b>Sensibilida de</b>	<b>1 - Especificidade</b>
10.00	.000	.000
13.00	.125	.000
→ 16.00	.250	.000
20.50	.375	.000
24.50	.375	.125
31.50	.500	.125
55.50	.500	.250
74.00	.500	.375
78.50	.500	.500
88.00	.625	.500
174.50	.625	.625
286.00	.625	.750
329.50	.750	.750
1065.00	.875	.750
3426.00	1.000	.750
8487.00	1.000	.875
11911.00	1.000	1.000

Legenda: a – O menor valor de corte é o valor mínimo de teste observado menos 1, e o maior valor de corte é o valor máximo de teste observado mais 1. Todos os outros valores de corte correspondem às médias de dois valores de teste consecutivamente ordenados.

Rácio C-T / AUC = 0,333; p = 1,000 ( $> 0,05$ )

Curva ROC

Verdadeiros positivos

Sensibilidade

1 - Especificidade

Falsos positivos

### Análise de sobrevida global

35

Tabela 5 - Tempos de sobrevivência e status de cada animal

Animal	Tempo de sobrevivência (dias)	Status
1	168	1
2	30	0
3	142	1
4	352	0
5	341	0
6	30	1
7	26	1
8	211	1
9	116	1
10	180	0
11	350	0
12	10	0
13	102	1
14	80	0
15	116	1

#### Teste de Kaplan-Meier para todos os animais em estudo

A análise de Kaplan-Meier relativa à sobrevida global dos animais em estudo pode ser observada no gráfico 5.

Gráfico 5 - Análise de sobrevivência de Kaplan-Meier dos animais em estudo

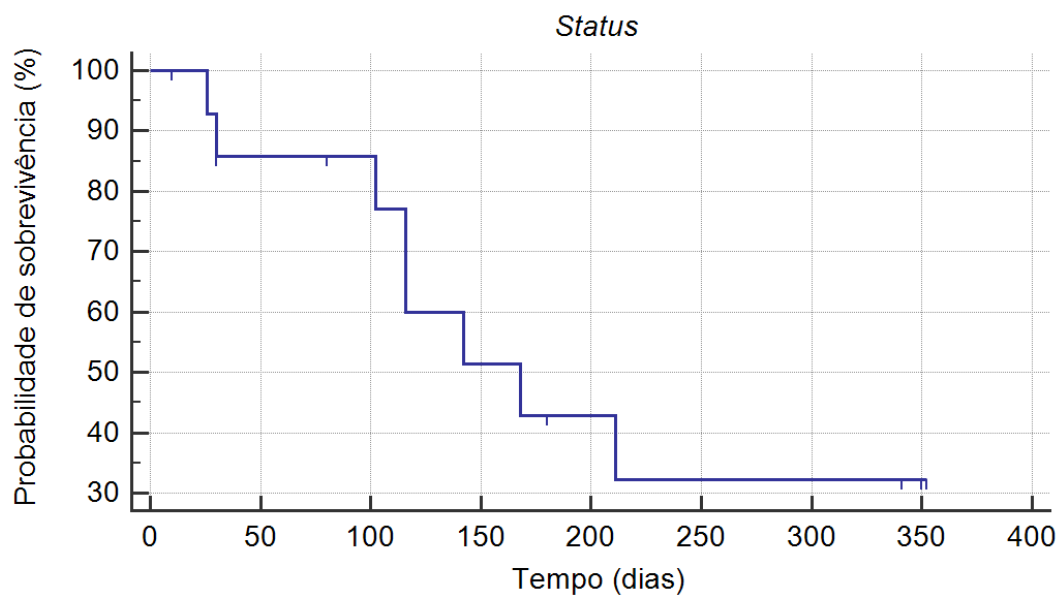


Tabela 6 - Mediana (e os respectivos intervalos de confiança) e erro-padrão da análise de sobrevivência de Kaplan-Meier

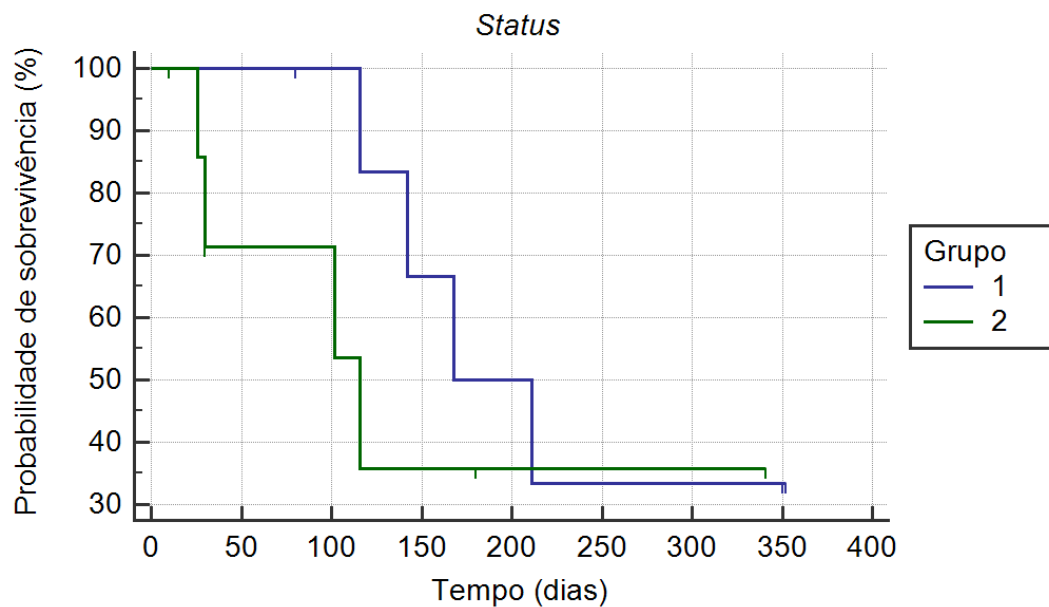
Erro-padrão	Mediana	IC a 95% para a mediana
34,236	168	116 – 211

Com base na análise da tabela 6, podemos verificar que a a mediana estimada da sobrevida global dos animais em estudo foi de 168 dias [IC 95% (116 - 211)]. O erro-padrão associado foi de 34,236.

#### Comparação das curvas de Kaplan-Meier dos animais com (grupo 2) e sem metastização (grupo 1) do MMO

A curva de Kaplan-Meier que permitiu comparar a sobrevida global dos cães com MMO não metastizado (grupo 1) com a dos cães com MMO metastizado (grupo 2) foi representada num único plano cartesiano, como se pode observar no gráfico 6.

Gráfico 6 - Curva de Kaplan-Meier referente aos cães com MMO não metastizado e curva de Kaplan-Meier referente aos cães com MMO metastizado, representadas num único plano cartesiano





Quatro indivíduos do grupo 1 (sem metástases) e 4 do grupo 2 (com metástases) apresentaram o resultado de interesse (morte).

Analisando a tabela 7, abaixo representada, verifica-se que a mediana de sobrevida dos cães sem metástases (grupo 1) foi de 168 dias, sendo superior à mediana de sobrevida do grupo 2 - cães com metástases (mediana de sobrevida de 116 dias). No entanto, a diferença observada não apresentou significado estatístico dado que o nível de significância ( $p$ ) foi de 0,4033 ( $>\alpha$ ). Com base no teste de log-rank, observou-se que o qui-quadrado foi de 0,6984.

Tabela 7 - Média e mediana (e os respectivos intervalos de confiança) e erro-padrão das análises de sobrevivência de Kaplan-Meier para os cães com e sem metástases

Grupo	Erro-padrão	Mediana	IC a 95% para a mediana
1	38,894	168	142-211
2	53,395	116	30-116
Geral	34,236	168	116-211

## Discussão

A espécie *canis familiaris* possui a maior variabilidade fenotípica que se conhece. Esta variabilidade impõe claras limitações no diagnóstico e tratamento de algumas afeções, nomeadamente os tumores sólidos. O estadiamento clínico destes tumores baseia-se num sistema de classificação que tem em consideração 3 parâmetros: o tamanho (T), a invasão linfática (N) e a metastização (M). Todavia, mais do que o diâmetro avaliado no parâmetro T do sistema TNM, o volume tumoral (equivalente à variável VTP deste estudo) quantificado pelo espaço tridimensional ocupado pelo tumor tem sido uma variável que tem merecido a atenção dos investigadores. Este constitui um poderoso indicador de prognóstico em melanomas cutâneos locais no Homem (Voss et al., 2014). No entanto, a avaliação do volume tumoral enquanto variável absoluta nesta espécie é válida, uma vez que a variabilidade de tamanhos, pesos e conformações é bastante baixa comparativamente com aquela que é observada no cão.

Assim, apesar de o primeiro parâmetro (T - diâmetro máximo do tumor primário) e do volume do tumor primário (VTP) serem poderosos indicadores de prognóstico, estes não têm em consideração a proporcionalidade entre o indivíduo e a massa. Exemplificando, um tumor que ocupa um determinado volume num cão com 2 kg como um Yorkshire Terrier não conduz a um impacto equivalente comparativamente a outro com 40 kg como um Rottweiler. Desta forma, neste estudo optou-se por avaliar não só a influência do VTP no prognóstico do MMO, mas também do VTP em relação à dimensão do cão (rácio C-T), escolhendo o VTC como variável representante do tamanho do cão. Esta escolha prende-se com o facto de esta ser uma medida fidedigna, uma vez que é independente da condição corporal, ao contrário do peso. Na verdade, o peso seria um indicador mais fácil e rápido para representar a dimensão do animal pois não implica fazer medições nem cálculos. Contudo, este é altamente variável consoante a condição corporal do indivíduo, podendo conduzir a conclusões erradas acerca do seu tamanho real, em particular perante situações de obesidade.

O tamanho amostral utilizado neste estudo constituiu a sua principal limitação pois este estudo baseou-se na recolha retrospectiva de casos. Como tal, recorreu-se à análise de potência (*power analysis*), estimando o número de observações necessárias para que seja detetável o efeito pretendido (McDonald, 2009). O tamanho mínimo recomendado para constituir um poder de 90% e um nível de significância de 5% seria de 1104 indivíduos, considerando uma prevalência de metástases em 50% dos indivíduos e uma variabilidade de 20%, valor bastante superior ao utilizado para a realização deste estudo (n=16). O tamanho da amostra é, de facto, muito reduzido, comparativamente à dimensão do universo em estudo - cães com MMO – uma vez que esta é a neoplasia oral mais frequentemente diagnosticada nesta espécie, como referido anteriormente. Desta forma, os dados

disponíveis não permitem concluir que os resultados obtidos nos testes estatísticos sejam estimadores corretos dos parâmetros da população, carecendo assim de significância e potência estatística. Apesar deste fator limitante, todos os resultados encontram-se discutidos em seguida.

A maior representação de machos em relação às fêmeas vai de encontro aos resultados de alguns estudos que apontam para uma maior incidência de MMO em machos, sendo um achado semelhante ao que se verifica também em medicina humana (Smith et al., 2002; Liptak & Withrow, 2013; Brockley et al, 2013; Boston et al., 2014). Apesar de haver autores que referem não existir qualquer predisposição sexual no MMO (Ramos-Vara et al., 2000).

A maioria dos cães em estudo tinham uma idade superior a 10 anos como foi também descrito por Ramos-Vara e colaboradores (2000). A idade média registada foi também semelhante àquela encontrada na literatura (Liptak & Withrow, 2013; Boston et al., 2014). As idades observadas nos animais em estudo eram esperadas pois as neoplasias desenvolvem-se com maior frequência em animais seniores.

Verificou-se neste trabalho um número semelhante de cães de raça pura e de cães sem raça definida. As raças mais representadas foram Cocker Spaniel e Caniche Anão, as quais têm uma grande popularidade em Portugal, podendo influenciar na sua maior representação, mas são também descritas por diversos autores como sendo raças predispostas para o aparecimento de MMO (MacEwen et al., 1999; Smith et al., 2002; Proulx et al., 2003; Requicha, 2010; Liptak & Withrow, 2013; Boston et al., 2014). Também o Pequês e o Retriever do Labrador foram raças encontradas neste grupo e descritas como predispostas por alguns autores (Ramos-Vara et al., 2000; Proulx et al, 2003; Boston et al., 2014; Nishiya et al., 2016). Houve um caso de um Spitz Alemão Anão, a qual é uma raça é considerada de pequeno porte (peso corporal <23kg) e, como tal, é mais propensa ao desenvolvimento de MMO (Liptak & Withrow, 2013). Por último, um dos casos registados foi num Cão de Água Português. Esta raça, apesar de não constar na maioria das listas de raças predispostas para o desenvolvimento de MMO, é caracterizada por ter uma mucosa oral intensamente pigmentada, o que segundo alguns autores, é uma característica que predispõe para o aparecimento de MMO (Morris & Dobson, 2001). Observou-se também que a maioria dos casos correspondiam a cães de porte pequeno, o que vai de encontro ao descrito por Liptak & Withrow (2013), de que o MMO é uma neoplasia mais frequentemente observada em cães de porte pequeno, como já foi discutido.

Em relação ao local anatómico do tumor, verificou-se que a maioria dos casos se localizavam na gengiva e um no lábio, o que corrobora o descrito por Ramos-Vara et al. (2000) de que a maioria dos MMO se localiza na gengiva ou no lábio e só raramente aparecem noutros locais, como a língua ou o palato. A distribuição anatómica dos MMO que

tinham origem na gengiva foi semelhante entre a gengiva maxilar e a mandibular. Esta informação está de acordo com o estudo de Proulx et al. (2003) que não registou uma diferença significativa entre a incidência de MMO na gengiva maxilar e mandibular, apesar de a maioria dos estudos indicarem uma maior prevalência de MMO na mandíbula em relação à maxila (Boria et al., 2004; Bergin et al., 2011; Dank et al., 2012; Boston et al. 2014) e de alguns descreverem uma maior incidência de MMO na maxila, relativamente à mandíbula (Hahn et al., 1994; Freeman et al., 2003). Em relação à localização rostral *versus* caudal, a maioria dos casos eram caudais – maxila e mandíbula caudal, e os restantes rostrais - maxila e mandíbula rostral. Estes dados corroboram o descrito por Proulx et al. (2003) e Dank et al (2012) em que a maioria dos MMO se localizava caudalmente, apesar de não estarem em concordância com os estudos de Hahn et al. (1994), Freeman et al. (2003) e Boston et al. (2014), em que a maioria dos MMO se localizavam rostralmente.

Existem dois fatores que podem ter contribuído para uma maior inclusão de casos de MMO de localização caudal, verificada neste estudo:

O facto de a TC de crânio ser um dos critérios inclusão. Os tumores caudais são, geralmente, de mais difícil acesso que os rostrais, encontrando-se menos expostos e visíveis. Como tal, há uma maior necessidade em recorrer aos exames complementares diagnósticos imagiológicos para perceber a totalidade da sua extensão anatómica, sendo a TC o mais indicado. Contudo, tendo em conta que este é um exame relativamente dispendioso para a maioria dos donos de cães em Portugal, por vezes, o recurso ao mesmo apenas se verifica nos casos em que não se consegue perceber a verdadeira extensão anatómica do tumor, nomeadamente os que se localizam caudalmente. Assim, é possível que nestes casos haja uma maior “pressão” por parte do médico veterinário (MV) para a realização deste exame, apesar dos custos associados. Esta hipótese ajudaria a explicar a maior prevalência de tumores caudais verificada neste estudo.

Muitas vezes, as lesões localizadas caudalmente são diagnosticadas mais tardiamente e, consequentemente, em estadio mais elevado de doença. Assim, o risco de haver metástases nos linfonodos regionais e a nível sistémico nestes casos é, geralmente, superior ao dos MMO rostrais. Logo, e sabendo que a TC é o exame imagiológico mais sensível para a deteção de nódulos metastáticos, existe uma maior necessidade técnica de avaliar estes animais desta forma comparativamente com os restantes casos.

A nível histológico apenas uma pequena percentagem dos animais em estudo foi diagnosticada com MMO amelanótico, a qual foi inferior à descrita por Requicha (2010) de 26,9% e à de 33% descrita por Liptak & Withrow (2013) e Biller et al. (2016). O facto de alguns dos tumores orais não permitirem um diagnóstico definitivo apenas com base no exame citológico e/ou histológico tradicional, como é o caso de alguns melanomas

amelanóticos, obriga a que a amostra seja sujeita a imuno-histoquímica. Porém, à semelhança do que acontece com a TC, a imuno-histoquímica implica um custo acrescido, o qual muitas das vezes é fator inibitório para os donos. Para além disso, este exame é, por vezes, desvalorizado pelos donos e/ou MV, que não consideram relevante saber com precisão qual a neoplasia em curso, preferindo investir o orçamento disponível em tratamentos, nomeadamente na cirurgia. Como tal, e tendo em conta que todos os casos incluídos no estudo tinham obrigatoriamente de ter um diagnóstico definitivo, é possível que alguns dos casos excluídos por falta de diagnóstico definitivo, fossem, de facto, MMO amelanótico pois este tumor fazia parte dos diagnósticos diferenciais e é a neoplasia oral maligna mais comum no cão (Requicha, 2010; Liptak & Withrow, 2013). Desta forma, a a probabilidade de que os casos sem diagnóstico histológico definitivo fossem na realidade MMO amelanóticos é relativamente elevada. Seria então bastante provável que fossem incluídos mais casos neste estudo correspondentes a MMO amelanótico, aumentando assim a prevalência de casos amelanóticos para valores próximos aos descritos na bibliografia (Liptak & Withrow, 2013; Biller et al., 2016).

Na maioria dos casos a extensão anatómica do tumor foi classificada como T2. Estes resultados são semelhantes àqueles encontrados na literatura (Murphy et al., 2005; Boston et al., 2014). Este resultado – maioria dos MMO de diâmetro máximo superior a 2 cm – pode dever-se ao facto de os donos e o MV não avaliarem a cavidade oral regularmente, ao facto de ser difícil uma completa e correta avaliação desta região anatómica sem sedar o animal e ao facto de os sintomas apenas surgirem quando o tumor apresenta grandes dimensões.

A proporção de casos que apresentava sinais de metastização nos linfonodos cervicais (N1b, N2b ou N3) aquando o diagnóstico foi de encontro ao descrito por Proulx et al. (2003) e Williams e Packer (2013) que descrevem taxas de metastização nos linfonodos regionais de 59% e 53%, respetivamente. De facto, o MMO é uma neoplasia com elevada taxa de metastização, a qual segundo Morris e Dobson (2011) pode ir dos 41 aos 74%, como se verificou neste estudo. Sublinhe-se, no entanto, que a análise citológica e/ou histológica dos linfonodos cervicais apenas foi realizada em 5 casos (31,25%), sendo que nos restantes 11 esta avaliação foi baseada apenas na palpação e interpretação das imagens de TC dos linfonodos regionais. Todavia, apesar do aumento dos linfonodos estar correlacionado com a sua metastização, este achado não é 100% sensível nem específico, sendo que um cão com MMO e linfadenomegália pode não ter metastização linfática e vice-versa. De facto, Williams e Packer (2003) conduziram um estudo acerca da associação entre o tamanho dos linfonodos e a sua metastização e concluíram que a sensibilidade e especificidade da linfadenomegália como indicador de metastização linfática era de 70 e 51%, respetivamente. Como tal, estes 11 casos podem corresponder a falsos positivos ou a falsos negativos, uma vez que a PAAF do linfonodo mandibular, a qual é o exame recomendado para a deteção de

metástases linfáticas em cães com MMO, não foi realizado na maioria dos casos (Liptak & Withrow, 2013; Biller et al., 2016).

A metastização a nível sistémico, nomeadamente nos pulmões, foi inferida com base nas TCs de cada animal e nos casos em que não estavam disponíveis TCs de tórax a inferência foi feita a partir de radiografias torácicas. Com base nestes exames a maioria dos animais não tinha evidências de metastização sistémica. A prevalência de metastização sistémica verificada neste estudo insere-se no intervalo de 14 a 92 % descrito por Morris e Dobson (2011) para o MMO. Contudo, podem haver neste estudo alguns falsos negativos, uma vez que em 5 dos casos (31,25%) não estavam disponíveis TCs do tórax dos animais para a avaliação pulmonar relativamente à presença de metástases, apenas radiografias. Assim, estes casos podem representar falsos negativos, uma vez que a ocorrência de micrometástases não pode ser totalmente descartada apenas com base no raio-X de tórax. Este exame imagiológico é inferior à TC na deteção de doença metastática pois não permite a deteção de nódulos de dimensão inferior a 5 milímetros de diâmetro, enquanto a TC tem uma sensibilidade bastante superior e deteta nódulos a partir de 1 milímetro de diâmetro (Johnson & Wisner, 2007; Kealy et al., 2011; Dias, 2012; Alexander et al., 2012).

A taxa de metastização global registada, tanto nos linfonodos cervicais como sistemicamente, foi inferior ao descrito por Liptak & Withrow (2013) e Biller et al. (2016), que referem uma taxa de metastização global em cães com MMO de, aproximadamente, 80%. Este dado pode estar correlacionado com o facto de nem todos os animais terem exames citológicos e/ou histológicos dos linfonodos cervicais, como já foi discutido, e com o facto de nem todos terem TC de tórax, mas apenas radiografias, como também já foi referido.

Os valores de VTP registados foram bastante variados, como se conclui pelo elevado desvio-padrão e alongado intervalo de confiança. A variabilidade verificada neste estudo pode ser justificada pelo facto de serem incluídos cães classificados em qualquer um dos 4 estadios clínicos para o MMO. Para além disso, também, a inclusão de casos de recidiva de MMO pode ter conduzido a valores mais baixos de VTP quando deveriam ser mais elevados. Nestes casos particulares a lesão tumoral costuma ser detetada muito mais precocemente, dado que os donos e o MV estão mais alerta e o animal é seguido com mais regularidade no período pós tratamento cirúrgico.

De modo semelhante ao observado para o VTP, também o VTC registou um grande desvio-padrão e um extenso intervalo de confiança. A discrepância entre os resultados obtidos prende-se com o facto de os exemplares da espécie canina apresentarem uma profunda disparidade de tamanhos e morfologias cranianas e, conseqüentemente, apresentarem diferentes dimensões cranianas.

Relativamente aos valores de rácio C-T obtidos estes foram também bastante dispersos entre si, como seria expectável, dado que este fenómeno se verificou para o VTP e VTC e o rácio C-T é o resultado da razão entre estas duas variáveis.

Considerando a grande distribuição de valores de rácio C-T, isto é, a marcada heterocedasticidade do estudo, optou-se pela transformação logarítmica desta variável, como foi apresentada na tabela 2 no capítulo dos resultados. A transformação dos dados implica um conjunto de procedimentos de manipulação dos mesmos de modo a ajustar a sua distribuição, facilitando a sua exibição (Duarte, 2014). Este mecanismo pode também ser utilizado em dados com distribuições anormais, quando é necessário submetê-los a testes estatísticos paramétricos (Campos, 2000; Duarte, 2014). Contudo, este não foi o caso do nosso estudo, uma vez que os testes estatísticos realizados, teste U de Mann-Whitney e de Kaplan-Meier, não são paramétricos e, como tal, a transformação logarítmica dos valores de rácio C-T teve como único propósito tornar mais fácil e agradável a leitura dos resultados.

### Associação entre o rácio C-T e a presença de metástases linfáticas e/ou sistémicas

A análise do teste U de Mann-Whitney revelou a presença de um *outlier* no grupo 1 (cães com MMO não metastizado), o qual equivale ao rácio C-T mais elevado desta amostra, de 5064. Este indivíduo corresponde ao único animal em estudo cujo tumor se localizava no lábio e também o único que foi classificado com o estadio associado ao prognóstico mais favorável – T1N0M0. Este elevado rácio C-T pode ser devido a 2 fatores: a exposição da lesão tumoral e o porte do animal. Por um lado, devido à localização labial, este tumor encontrava-se muito mais exposto que os restantes, facilitando a sua deteção pelo dono, contribuindo para o seu diagnóstico precoce. Esta massa foi rapidamente detetada e, como tal, apresentava reduzidas dimensões (0,798 X 0,608 X 0,828 cm). De facto, uma lesão de pequena dimensão significa um menor denominador (VTP) e, consequentemente um maior rácio C-T. Por outro lado, este animal é um cão de porte médio-grande (peso > 25kg), tendo registado o segundo maior VTC do estudo (2036 cm<sup>3</sup>), ao contrário da maioria dos animais em estudo que eram cães de porte pequeno. Com efeito, um grande porte está associado a um maior numerador (VTC) e, consequentemente também a um maior rácio C-T.

À exceção do *outlier*, o grupo com metastização apresentava, de um modo geral, valores de rácio C-T inferiores ao grupo sem metástases de acordo com o que era esperado. Isto porque, por um lado, os animais com um maior VTP em relação ao seu VTC correspondem aos menores rácios C-T observados pois estes casos equivalem a maiores denominadores (VTPs) em relação aos numeradores (VTCs). Por outro lado, os animais cujo VTP tem um impacto maior, ou seja, os que apresentam um menor rácio C-T estão, à partida, associados a um prognóstico menos favorável e à existência de metástases aquando o diagnóstico. Contudo, a diferença observada entre as medianas dos dois grupos é bastante pequena, não permitindo concluir que um dos grupos tenha valores de rácio C-T significativamente distintos do outro grupo.

Por esse motivo, não foi possível identificar qualquer associação entre o rácio C-T e o prognóstico. Este resultado pode ter sido devido em parte ao tamanho reduzido da amostra. Para além disso, existe uma diferença entre significância estatística e significância clínica, sendo que estas não são mutuamente exclusivas, mas sim complementares e, como tal, o valor de p não deve ser o único fator a ter em consideração na discussão dos resultados (Cohen, 1998; Lopes et al., 2014). Desta forma, apesar de neste estudo o nível de significância estatística ser superior ao erro considerado de 5%, o rácio C-T continua a poder ser um índice promissor na avaliação do prognóstico do MMO, uma vez que o VTP já provou sê-lo em outros estudos, tanto em medicina humana (Knegjens et al., 2010; Joo et al., 2013; Zang et al., 2016), como em veterinária (Hahn et al., 1994; Proulx et al., 2003; Tuohy et al., 2014). Como já foi previamente referido, o facto de os indivíduos da espécie canina apresentarem marcadas diferenças de tamanho e peso, consoante a sua raça e



porte, não deve ser desprezado, dado que é algo que não influi da mesma forma na espécie humana. Como tal, um mesmo valor de VTP pode representar significados distintos em cães de diferentes portes, já que o tamanho relativo de um tumor de igual volume é maior num cão miniatura do que o é num cão gigante.

As curvas ROC obtidas não permitiram identificar valores de corte, com significado estatístico que permitissem discriminar indivíduos com e sem metástases no momento do diagnóstico. O valor da AUC para o rácio C-T como indicador de metastização linfática e o do rácio C-T como indicador de metastização sistémica não foram considerados satisfatórios, uma vez que devem ser superiores a 0,7 (Margotto, 2010).

A mediana de sobrevida global de todos os animais incluídos no estudo, embora baseada numa amostra de pequena dimensão, foi comparável à relatada em estudos anteriores (Ramos-Vara et al., 2000; Boria et al., 2004) mas inferior aos trabalhos de Dank et al. (2012) e Boston et al. (2014). Estas diferenças podem ser explicadas pelos tratamentos efetuados nos animais em estudo, tendo sido na sua maioria cirurgia e em alguns casos terapias adjuvantes ou até mesmo nenhum protocolo terapêutico. Para além disso, muitos destes trabalhos incluem animais sem metástases linfáticas e/ou sistémicas, algo que também não se verificou neste estudo. Desta forma, na maioria dos estudos de MMO os cães estão, à partida, associados a um prognóstico mais favorável devido às condições expostas. Contudo, ainda assim, e confrontando a sobrevida comparada dos dois grupos - cães sem metástases e cães com metástases -, não foram encontradas diferenças significativas. Outros fatores, para além dos já mencionados, podem ter contribuído para um tempo mediano de sobrevida global mais baixo neste estudo, como o facto de se terem incluído 4 casos que foram recidivas de MMO, os quais estão associados, à partida, a um pior prognóstico e, consequentemente, a uma menor sobrevida global. Outra causa pode ter sido a elevada proporção de casos censurados na curva de análise de sobrevivência de Kaplan-Meier, dado que, quanto maior o número de censurados, menos confiável será a curva de sobrevivência (Rich et al., 2010). Neste estudo 3 dos cães foram censurados por ausência de acompanhamento e 4 foram censurados porque ainda se encontravam vivos aquando o término do estudo.

## **Conclusões**

Apesar do rácio C-T e do VTP serem parâmetros promissores, não foi possível neste estudo comprovar o seu poder enquanto indicadores de prognóstico do MMO devido a um limitado tamanho amostral.

Seria, portanto, de extrema importância continuar a realização deste trabalho com um maior tamanho amostral que permitisse identificar o potencial impacto do rácio C-T no prognóstico do MMO no cão e o seu valor preditivo de ocorrência de metástases.

## Bibliografia

- Alexander, K., Joly, H., Blond, L., d'Anjou, M. A., Nadeau, M. È., Olive, J. & Beauchamp, G. (2012). A comparison of computed tomography, computed radiography, and film-screen radiography for the detection of canine pulmonary nodules. *Veterinary radiology and ultrasound*, 53(3), 258-65.
- Argyle, D. J & Khanna, C. (2013). Tumor Biology and Metastasis. In S. J. Withrow, D. M Vail & R. L. Page, *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. (5<sup>th</sup> ed.) (pp.30-50). St. Louis, Missouri: Elsevier/Saunders.
- Berg, J. (1998). Principles of oncologic orofacial surgery. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 13 (1), 38-41
- Bergin, I. L., Smedley, R. C., Esplin, D. G., Spangler, W. L. & Kiupel, M. (2011). Prognostic evaluation of Ki67 threshold value in canine oral melanoma. *Veterinary Pathology*, 48, 41-53.
- Bergman, P.J. (2007). Canine oral melanoma. In W.S. Dernell (Ed.), *Clinical Techniques in Small Animal Practice*. (2<sup>nd</sup> ed.) (pp.55-60). Amsterdam: Elsevier Health
- Bergman, P. J., Kent, M. S. & Farese, J. P. (2013). Melanoma. In S. J. Withrow, D. M Vail & R. L. Page, *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. (5<sup>th</sup> ed.) (pp.321-334). St. Louis, Missouri: Elsevier/Saunders.
- Bergman, P.J., McNight, J., Novosad, A., Charney, S., Farrelly, J., Craft, D., Wulderk, M., Jeffers, Y., Sadelain, M., Hohenhaus, A.E., Segal, N., Gregor, P., Engelhorn, M., Riviere, I., Houghton, A.N. & Wolchok, J.D. (2003). Long-term survival of dogs with advanced malignant melanoma after DNA vaccination with xenogeneic human tyrosinase: a phase I trial. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 9, 1284-1290.
- Bergman, P. J. & Wolchok, J. D. (2008). Of mice and men (and dogs): development of a xenogeneic DNA vaccine for canine oral malignant melanoma. *Cancer Therapy*, 6, 817-826.
- Bezuidenhout, A. (2013). The Lymphatic System. In H. E. Evans & A. De Lahunta, *Miller's anatomy of the dog*. (4<sup>th</sup> edition) (pp.535-557). St. Louis, Missouri: Elsevier.
- Bielenberg, D. R., Zetter, B. R. (2015). The contribution of angiogenesis to the process of metastasis. *The Cancer Journal*, 21 (4), 267-273.

- Billar, B., Berg, J., Garrett, L., Ruslander, D., Wearing, R., Abbott, B., Patel, M., Smith, D. & Bryan, C. (2016). 2016 AAHA Oncology Guidelines for Dogs and Cats. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 52 (4), 181-204.
- Blackwood, L. & Dobson, J.M. (1996). Radiotherapy of oral malignant melanomas in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 209, 98.
- Boria, P.A., Murry, D.J., Bennett, P.F., Glickman, N.W., Snyder, N.W., Merkel, B.L., Schlittler, D.L., Mutsaers, A.J., Thomas, R.M. & Knapp, D.W. (2004). Evaluation of cisplatin combined with piroxicam for the treatment of oral malignant melanoma and oral squamous cell carcinoma in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 224, 388-394.
- Bostock, D.E. (1979). Prognosis after surgical excision of canine melanomas. *Veterinary pathology*, 16 (1), 32-40.
- Boston, S.E., Lu, X., Culp, W.T. N., Montinaro, V., Romanelli, G., Dudley, R.M., Liptak, J.M., Mestrinho, L. & Buracco, P. (2014). Efficacy of systemic adjuvant therapies administered to dogs after excision of oral malignant melanomas: 151 cases (2001–2012). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 245 (4), 401-407.
- Braeuer, R. B., Watson, I. R., Wu, C. J., Mobley, A. K., Kamiya, T., Shoshan, E. & Bar-Eli, M. (2013). Why is melanoma so metastatic?. *Pigment cell and melanoma research*, 27 (1), 19-36.
- Brockley, L.K., Cooper, M.A. & Bennett, P.F. (2013). Malignant melanoma in 63 dogs (2001–2011): the effect of carboplatin chemotherapy on survival chemotherapy on survival. *New Zealand veterinary journal*, 61, 25-31.
- Campos, G. M. (2000). *Estatística prática para docentes e pós-graduados - Transformação dos dados amostrais*. Acedido em Fev. 9, 2018, disponível em [http://143.107.153.201/restauradora/gmc/gmc\\_livro/gmc\\_livro\\_cap13.html](http://143.107.153.201/restauradora/gmc/gmc_livro/gmc_livro_cap13.html)
- Cardoso, E. A. D. (2009). *Moléculas de adesão celular – o papel do microambiente tumoral na carcinogénese*. Trabalho realizado para obtenção do grau de mestre em medicina – Área científica de Anatomia Patológica. Coimbra: Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.
- Cohen, J. (1998) The concepts of power analysis. In J. Cohen, *Statistical power analysis for the behavioral sciences* (1<sup>st</sup> ed.) (pp. 1-17) Hillsdale, New Jersey: Academic Press, Inc.
- Dank, G., Rassnick, K. M., Sokolovsky, Y., Garrett, L. D., Post, G. S., Kitchell, B. E., Sellon, R. K., Kleiter, M., Northrup, N. & Segev, G. (2012). Use of adjuvant carboplatin for treatment of dogs with oral malignant melanoma following surgical excision. *Veterinary and comparative oncology*, 12 (1), 78–84.

- Dias, J. N. R. (2012). *Diagnóstico imagiológico de metastização pulmonar: radiografia versus TC computadorizada*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- Dow, S.W., Elmslie, R.E., Willson, A.P., Roche, L., Gorman, C. & Potter, T.A. (1998). In vivo tumor transfection with superantigen plus cytokine genes induces tumor regression and prolongs survival in dogs with malignant melanoma. *The Journal of clinical investigation*, 101, 2406-2414.
- Duarte, A. (2014). *Transformação de dados*. Acedido em Fev., 9, 2018, disponível em <https://pt.slideshare.net/alexandrend/transformao-de-dados>
- Esplin, D.G. (2008). Survival of dogs following surgical excision of histologically well-differentiated melanocytic neoplasms of the mucous membranes of the lips and oral cavity. *Veterinary pathology*, 45, 889-896.
- Freeman, K.P., Hahn, K.A., Dee-Harris, F. & King, G.K. (2003). Treatment of dogs with oral melanoma by hypofractionated radiation therapy and platinum-based chemotherapy (1987–1997). *Journal of veterinary internal medicine of the American College of Veterinary Internal Medicine*, 17, 96-101.
- Friedrichs, K. R & Young, K. M. (2013). Diagnostic Cytopathology in Clinical Oncology. In S. J. Withrow, D. M Vail & R. L. Page, *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. (5<sup>th</sup> ed.) (pp.111-130). St. Louis, Missouri: Elsevier/Saunders.
- Goldschmidt, M. H. & Goldschmidt, K. H. (2016). Epithelial and melanocytic tumors of the skin. In D. J., Meuten, *Tumors in domestic animals*. (5<sup>th</sup> ed.) (pp.88-131). Ames, Iowa: John Wiley & Sons.
- Gross, T. L., Ihrke, P. J., Walder, E. J. & Affolter, V. K. (2005). Melanocytic Tumors. In T. L. Gross, P. J. Ihrke, E. J., Walder, V. K., Affolter, *Skin diseases of the dog and cat. Clinical and histopathological findings*. (2<sup>nd</sup> ed.) (pp. 813-833). Oxford: Blackwell Science Ltd.
- Hahn, K.A., DeNicola, D.B., Richardson, R.C. & Hahn, E.A. (1994). Canine oral malignant melanoma: prognostic utility of an alternative staging system. *Journal of Small Animal Practice*, 35, 251-256.
- Haigh, P. I., Glass, E. C. & Essner, R. (2000). Accuracy of gamma probes in localizing radioactivity: in-vitro assessment and clinical implications. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 15, 561–569.
- Hashemi-Pour, M.S. (2007). Malignant melanoma of the oral cavity. *Journal of Dentistry of Tehran University of Medical Sciences*, 4 (1), 44-51.



- Itoh, H., Toshiyuki, M., Mukaiyama, T., Goto, T., Hata, K., Azuma, K., Tsuka, T., Osaki, T., Imagawa, T. & Okamoto, Y. (2014). Non-surgical treatment of canine oral malignant melanoma: a case study of the application of complementary alternative medicine. *Oncology Letters*, 7, 1829-1830.
- Johnson, E.G. & Wisner, E.R. (2007). Advances in respiratory imaging. *Veterinary Clinics Small Animal Practice*, 37, 879-900.
- Joo, Y. H., Hwang, S. H., Sun, D. I., Cho, K. J., Park, J. O., Kim, M. S. (2013). Relationships between Tumor Volume and Lymphatic Metastasis and Prognosis in Early Oral Tongue Cancer. *Clinical and Experimental Otorhinolaryngology*, 6 (4), 243-248.
- Kauzman, A., Pavone, M., Blanas, N., Bradley, G. (2004). Pigmented Lesions of the Oral Cavity: Review, Differential Diagnosis, and Case Presentations. *Journal of the Canadian Dental Association*, 70 (10), 682-683.
- Kirpensteijn, J. & Boston, S. (2016). Canine Oral Malignant Melanoma, *ECVS proceedings 2016: small animal soft tissue session*, 113.
- Kealy, J.K. (2011). The thorax. In J.K., Kealy, J.P., Graham, & H., McAllister, *Diagnostic Radiology and Ultrasonography of the Dog and Cat*. (5<sup>th</sup> ed.) (pp. 199-349). United States of America: Elsevier Saunders.
- Knegjens, J. L., Hauptmann, M., Pameijer, F. A., Alfons, J. B., Hoebers, F. J., de Bois, J. A., Kaanders, J. H., van Herpen, C. M., Verhoef, C. G., Wijers, O. B., Wiggendaad, R. G., Buter, J. & Rasch, C. R. (2010). *Tumor volume as prognostic factor in chemoradiation for advanced head and neck cancer*. Wiley Online Library. Acedido em Jul. 21, 2017, disponível em <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hed.21459/full>
- Kosovsky, J.K., Matthiesen, D.T., Marretta, S.M. & Patnaik, A.K (1991). Results of partial mandibulectomy for the treatment of oral tumors in 142 Dogs. *Journal of veterinary surgery*, 20 (6), 397-401.
- Kumar, V., Vishnoi, J.R., Kori, C.G., Gupta, S., Misra, S. & Akhtar, N. (2015). Primary malignant melanoma of oral cavity: a tertiary care center experience. *National journal of maxillofacial surgery*, 6(2), 167-171.
- Lagos, M. (2013). *Curvas de sobrevida das células: Radiobiologia*. Acedido em Dez. 21, 2017, disponível em <https://pt.slideshare.net/MARKLAGOS/curvas-de-sobrevida-celular-r12013-03>
- Liptak, J. M. & Lascelles, B. D. X. (2012). In S. T. Kudnig & B. Séguin, *Veterinary Surgical Oncology*. (pp. 119-178). Oxford, UK: Wiley-Blackwell

- Liptak, J. M. & Withrow, S. J. (2013). Oral Tumors. In S. J., Withrow, D. M., Vail & R. L., Page, *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. (5<sup>th</sup> ed.) (pp.381-398). St. Louis, Missouri: Elsevier/Saunders.
- London, C., Mathie, T., Stingle, N., Clifford, C., Haney, S., Klein, M. K., Beaver, L., Vickery, K., Vail, D. M., Hershey, B., Ettinger, S., Vaughan, A., Alvarez, F., Hillman, L., Kiselow, M., Thamm, D., Higginbotham, M. L., Gauthier, M., Krick, E., Phillips, B., LaDue, T., Jones, P., Bryan, J., Gill, V., Novasad, A., Fulton, L., Carreras, J., McNeil, C., Henry, C. & Gillings, S. (2012). Preliminary evidence for biologic activity of toceranib phosphate (Palladia®) in solid tumors. *Veterinary and Comparative Oncology*, 10, 194-205.
- Lopes, B., Ramos, I. C. O., Ribeiro, G., Correa, R., Valbon, B. F., Luz, A. C., Salomão, M., Lyra, J. M. & Junior, R. A. (2014). Bioestatísticas: conceitos fundamentais e aplicações práticas. *Revista Brasileira de Oftalmologia*, 73 (1), 16-22.
- Lurie, D.M., Seguin, B., Schneider, P.D., Verstraete, F.J. & Wisner, E.R. (2006). Contrast-assisted ultrasound for sentinel lymph node detection in spontaneously arising canine head and neck tumors. *Investigative Radiology*, 41, 415-421.
- MacEwen E.G., Kurzman, I.D., Vail, D.M., Dubielzig, R.R., Everlith, K., Madewell, B.R., Rodriguez, C.O., Phillips, B., Courtney, H., Zwahlen, C.H., Obradovic, J., Rosenthal, R.C., Fox, L.E., Rosenberg, M., Henry, C. & Fidel, J. (1999). Adjuvant therapy for melanoma in dogs: results of randomized clinical trials using surgery, liposome-encapsulated muramyl tripeptide, and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 5, 4249-4258.
- Machado, J. C. (2007). Instabilidade Genética e Cancerização. Acedido em Jun. 18, 2018, disponível em [http://cc04-10.med.up.pt/biopatteoricas/Aula19 InstabilidadeGenetica.pdf](http://cc04-10.med.up.pt/biopatteoricas/Aula19%20InstabilidadeGenetica.pdf)
- Margotto, P. R. (2010). *Curva ROC – Como fazer e interpretar no SPSS*. Acedido em Fev. 1, 2017, disponível em: [http://www.paulomargotto.com.br/documentos/Curva ROC SPSS.pdf](http://www.paulomargotto.com.br/documentos/Curva%20ROC%20SPSS.pdf)
- McDonald, J. H. (2009). Power Analysis. In J. H. McDonald, *Handbook of Biological Statistics*. (2<sup>nd</sup> ed.) (pp. 33-39). Baltimore, Maryland: Sparky House Publishing.
- McDonough, S. P. (2017). The Lymphoreticular System. In S. P., McDonough & T., Southard, *Necropsy Guide for Dogs, Cats, and Small Mammals* (1<sup>st</sup> ed.) (pp.133-143). Ames, Iowa: John Wiley & Sons.
- Modiano, J. F., Ritt, M. G. & Wojcieszyn, J. (1999). The molecular basis of canine melanoma: pathogenesis and trends in diagnosis and therapy. *Journal of veterinary internal medicine of the American College of Veterinary Internal Medicine*, 13, 163-174.



- Modiano, J. F. (2013). The Genetic Basis of Cancer. In S. J. Withrow, D. M Vail & R. L. Page, *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. (5<sup>th</sup> ed.) (pp.1-15). St. Louis, Missouri: Elsevier/Saunders.
- Morris, J. & Dobson, J. (2001). Head and Neck. In J. Morris & J. Dobson, *Small Animal Oncology*. (1<sup>st</sup> ed.) (pp.104-115). Oxford: Blackwell Science Ltd.
- Munday, J. S., Löhr, C. V. & Kiupel, M. (2016). Tumors of the alimentary tract. In D. J., Meuten, *Tumors in domestic animals*. (5<sup>th</sup> ed.) (pp.499-602). Ames, Iowa: John Wiley & Sons.
- Murphy, S., Hayes, A. M., Blackwood, L., Maglennon, G., Pattinson, H. & Sparkes, A. H. (2005). Oral malignant melanoma - the effect of coarse fractionation radiotherapy alone or with adjuvant carboplatin therapy. *Veterinary and comparative oncology*, 3(4), 222-229.
- Nishiya, A. T., Massoco, C. O., Felizzola, C. R., Perlmann, E., Batschinski, K., Tedardi, M. V., Garcia, J. S., Mendonça, P. P., Teixeira, T. F. & Dagli, M. L. (2016). Comparative Aspects of Canine Melanoma. *Veterinary Sciences*, 3, 7, 1-22.
- Owen, L.N. (1980). The TNM system. IN L.N. Owen, *TMN classification of tumours in domestic animals*. (1<sup>st</sup> ed.) (pp.6-11). Geneva: World Health Organization.
- Proulx, D. R., Ruslander, D. M., Dodge, R. K., Hauck, M. L., Williams, L. E., Horn, B., Price, S. & Thrall, D. E. (2003). A retrospective analysis of 140 dogs with oral melanoma treated with external beam radiation. *Veterinary radiology & ultrasound: the official journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association*, 44, 352-359.
- Ramos-Vara, J. A., Beissenherz, M. E., Miller, M. A., Johnson, G. C., Pace, L. W., Fard, A. & Kottler, S. J. (2000). Retrospective study of 338 canine oral melanomas with clinical, histologic, and immunohistochemical review of 129 cases. *Veterinary Pathology*, 37, 597-608.
- Rassnick, K.M., Ruslander, D.M., Cotter, S.M., Al-Sarraf, R., Bruyette, D.S., Gamblin, R.M., Meleo, K.A. & Moore, A.S. (2001). Use of carboplatin for treatment of dogs with malignant melanoma: 27 cases (1989–2000). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 218, 1444-1448.
- Requicha, J. F. M. F. (2010). *Neoplasias da cavidade oral do cão - Estudo retrospectivo de 14 anos*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Vila Real: Escola de Ciências Agrárias e Veterinárias - Departamento de Ciências Veterinárias da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

- Rich, J. T., Neely, J. G., Paniello, R. C., Voelker, C. C. J., Nussenbaum, B. & Wang, E. W. (2010). A practical guide to understanding Kaplan - Meier curves. *Journal of Otorrhology – Head and Neck Surgery*, 143 (3), 331-336.
- Smith, S. H., Goldschmidt, M. H. & McManus, P. M. (2002). A comparative review of melanocytic neoplasms. *Veterinary Pathology*, 39 (6), 651-678.
- Spangler, W. L. & Kass, P. H. (2006). The histologic and epidemiologic bases for prognostic considerations in canine melanocytic neoplasia. *Veterinary pathology*, 43 (2), 136-149.
- Sulaimon, S. S. & Kitchel, B. E. (2003). The basic biology of malignant melanoma: molecular mechanisms of disease progression and comparative aspects. *Journal of veterinary internal medicine of the American College of Veterinary Internal Medicine*, 17, 760-772.
- Forrest, L. (2013) The Cranial Nasal Cavities: Canine and Feline. In, D. E., Thrall, *Textbook of Veterinary Diagnostic Radiology* (6<sup>th</sup> ed.) (pp. 183-203). St. Louis, Missouri: Elsevier.
- Treggiari, E., Grant, J.P. & North, S.M. (2016). A retrospective review of outcome and survival following surgery and adjuvant xenogeneic DNA vaccination in 32 dogs with oral malignant melanoma. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 78 (5), 845-850.
- Tuohy, J.L., Selmic, L.E., Worley, D.R., Ehrhart, N.P. & Withrow, S.J. (2014). Outcome following curative-intent surgery for oral melanoma in dogs: 70 cases (1998-2011). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 254, 1266-1273.
- Vieira, R. J. D. C. (2013). *Oncogénese e progressão do melanoma: análise mutacional e estudo clínico retrospectivo*. Tese de Doutorado em Medicina Interna – Especialidade de Dermatologia e Venereologia – Universidade de Coimbra.
- Voss, B., Wilop, S., Jonas, S. El-Komy, M. H., Schaller, J., von-Felbert, V., Megahed, M. (2014). Tumor volume as a prognostic factor in resectable malignant melanoma. *Dermatology: international journal for clinical and investigative dermatology*, 228 (1), 66-70.
- Wallace, J., Matthiesen, D.T. & Patnaik, A.K. (1992). Hemimaxillectomy for the treatment of oral tumors in 69 dogs. *Journal of Veterinary Surgery*, 21 (5), 337-341.
- Weiss, E. & Frese, K. (1974). Tumours of the skin. *Bulletin of the World Health Organization*, (79-100). Geneva: World Health Organization.
- Weltman, E. (2009). Aplicações Clínicas da Radioterapia Estereotática Corporal. Acedido em Dez. 21, 2017, disponível em <http://www.sbradioterapia.com.br/pdfs/aulas/arqaulaevento26.pdf>

- Westberg, S., Sadeghi, A., Svensson, E., Segall, T., Dimopoulou, M., Korsgren, O., Hemminki, A., Loskog, A. S. I., Tötterman, T. H., von Euler, H. (2013). Treatment Efficacy and Immune Stimulation by AdCD40L Gene Therapy of Spontaneous Canine Malignant Melanoma. *Journal of Immunotherapy*, 36 (6), 350-358.
- Williams, L. E. & Packer, R. A. (2003). Association between lymph node size and metastasis in dogs with oral malignant melanoma: 100 cases (1987-2001). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 222, 1234-1236.
- Wong, S. L., Edwards, M. J., Chao, C., Tuttle, T. M., Noyes, R. D., Carlson, D. J., Cerrito, P. B. & McMasters, K. M. (2001). Sentinel lymph node biopsy for breast cancer: impact of the number of sentinel nodes removed on the false-negative rate. *Journal of the American College of Surgeons*, 192, 684-689.
- Zang, H., Seikaly, H., Nguyen, N. T., Abele, J. T., Dziegielewski, P. T., Harris, J. R. & O'Connell, D. A. (2016). Validation of metabolic tumor volume as a prognostic factor for oral cavity squamous cell carcinoma treated with primary surgery, *Oral Oncology*, 57, 6-14.
- Zanzonico, P. & Heller, S. (2000). The intraoperative gamma probe: basic principles and choices available. *Seminars in Nuclear Medicine*, 30, 33-48.

## Anexos

### Anexo I - Diversos dados relativos aos animais constituintes deste trabalho

Tabela 8 - Animais constituintes da amostra e as medições realizada

<b>Animal</b>	<b>Raça</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b>	<b>Porte</b>	<b>Diagnóstico</b>	<b>Localização</b>
1	Sem raça definida	Masculino	9	Médio-Grande	MMO	MxC
2	Cocker Spaniel	Masculino	13	Pequeno	MMO	MbC
3	Sem raça definida	Masculino	15	Pequeno	MMO	MxC
4	Cão de Água Português	Feminino	10	Médio-Grande	MMO	MbR
5	Sem raça definida	Masculino	9	Médio-Grande	MMO	MxC
6	Sem raça definida	Masculino	14	Pequeno	MMO	MxC
7	Caniche Anão	Feminino	14	Pequeno	MMO	MbC
8	Sem raça definida	Feminino	10	Pequeno	Amelanótico	MbC
9	Spitz Alemão Anão	Feminino	12	Pequeno	MMO	MbR
10	Caniche Anão	Feminino	14	Pequeno	MMO	MxR
11	Pequinês	Feminino	10	Pequeno	MMO	MbC
12	Sem raça definida	Masculino	11	Médio-Grande	MMO	L
13	Retriever do Labrador	Masculino	10	Médio-Grande	MMO	MbC
14	Sem raça definida	Masculino	10	Pequeno	MMO	MxC
15	Cocker Spaniel	Masculino	16	Pequeno	Amelanótico	MbC
16	Cocker Spaniel	Masculino	10	Pequeno	MMO	MxR